UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE GERSTENGLOBULINE

INAUGURAL-DISSERTATION

VON

OLOF QUENSEL

UPPSALA 1942
ALMQVIST & WIKSELLS BOKTRYCKERI-A.-B.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE GERSTENGLOBULINE

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE MIT GENEHMIGUNG DER MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHEN SEKTION DER WEITBERÜHMTEN PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT ZU UPSALA ZUR ÖFFENTLICHEN BEURTEILUNG VORGELEGT

VON

OLOF QUENSEL

FIL. LIC., UPL.

DIE VERTEIDIGUNG WIRD AM 13. MAI 1942 UM 10 UHR VORMITTAGS IM HÖRSAAL DES CHEMISCHEN INSTITUTS STATTFINDEN

UPPSALA 1942

ALMQVIST & WIKSELLS BOKTRYCKERI-A.-B.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548007_0013

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE GERSTENGLOBULINE

INAUGURAL-DISSERTATION

VON

OLOF QUENSEL

UPPSALA 1942
ALMQVIST & WIKSELLS BOKTRYCKERI-A.-B.

Inhaltsverzeichnis.

		Seite
Vorwort		5
Einleitung		7
	Allgemeines	7
	Grundlagen der Ultrazentrifugierung	14
Kap. I.	Präparationsmethoden	18
	Orientierende Versuche	18
	Fraktionierung durch Dialyse	22
	Fraktionierung durch Fällung mit Ammoniumsulfat	30
	Fraktionierung durch Zentrifugierung	38
	Präparationsschema	40
Kap. II.	Sedimentationskonstanten der Gerstenglobuline	46
Kap. III.	Stabilität der Gerstenglobuline	50
Kap. IV.	Elektrophoretische Untersuchungen	59
	Bestimmung der isoelektrischen Punkte	60
	Separierungsversuche	64
Kap. V.	Molekulargewichte und Diffusionskonstanten von Mischungen verschiedener Komponenten. Theorie	68
	Sedimentationsgleichgewicht	68
	Diffusion	82
Kap. VI.	Molekulargewichtsbestimmungen	86
	Bestimmung von Diffusionskonstanten	86
	Molekulargewichtsbestimmungen aus Sedimentations- und Diffusionskonstanten	88
	Molekulargewichtsbestimmungen aus Sedimentationsgleichgewichten	89
	Die Molekulargewichte der Globulinkomponenten	92
Zusammenfassung		94
Literaturverzeichnis		96

Vorwort.

Während des Jahres 1936 begannen am Physikalisch-Chemischen Institut in Upsala durch die Initiative von Herrn Professor The Svedberg und dem damaligen Chef für A. B. Stockholms Bryggerier, dem verstorbenen Fil. Dr. Bertil Almgren, Untersuchungen über die Rolle, die Proteine im Brauprozess spielen. Ich hatte die Gelegenheit an dieser Aufgabe arbeiten zu dürfen und bin Herrn Dr. Almgren, seinem Nachfolger, Herrn Direktor Sven Schwartz, und dem Chef für das Zentrallaboratorium der Brauerei, Fil. Dr. Harry Lundin, für die erspriessliche Zusammenarbeit zu grossem Dank verpflichtet.

Die Untersuchungen wurden finanziell durch A. B. Stockholms Bryggerier und die Wallenberg-Stiftung unterstützt.

Meinem Lehrer, Herrn Professor The Svedberg, danke ich für die aussergewöhnlichen Arbeitsmöglichkeiten, die er zu meiner Verfügung stellte, für Aufmunterung und Rat während der Ausführung und für die Freundschaft, die er mir entgegenbrachte, während der langen Zeit, wo ich mit seinem Institut verbunden war.

Mein Freund, Dr. phil. Hans Mosimann, hatte die Güte, die Arbeit ins Deutsche zu übersetzen, wofür ich ihm herzlich danke.

Mein Dank gehört ebenfalls den übrigen Arbeitskameraden am Institut, die mir auf manche Weise behilflich waren.

Zum Schluss möchte ich meiner Frau, Inga-Britta Eriksson-Quensel, danken. Sie half mir in den letzten Jahren bei der Arbeit, und ich wünschte, dass sie vollständig verstehen könnte, was sie mir hierbei bedeutete.

Ulriksdal, im April 1942.

Olof Quensel.

Einleitung.

Allgemeines.

In Pflanzensamen kommen Proteine in festem Zustand vor. Durch Extraktion mit passend gewählten Lösungsmitteln können sie mehr oder weniger vollständig in Lösung gebracht werden. Es hat sich jedoch erwiesen, dass die Menge und Art der extrahierten Proteine auf der Natur des angewandten Lösungsmittels beruhen, was mit dem Vorkommen einer Anzahl Proteine mit mindestens teilweise verschiedenen Eigenschaften in Beziehung gesetzt wurde. Da verschiedene Löslichkeit unter variierenden Bedingungen der am meisten in die Augen fallende Unterschied zwischen gewissen Proteinen oder Proteingruppen ist, so ist es ganz natürlich, dass man die Löslichkeit ihrer Klassifizierung zugrunde zu legen suchte. Dabei spielten Osbornes bahnbrechende Arbeiten (*23*) im Schluss des vorigen und im Anfang dieses Jahrhunderts eine grosse Rolle.

Unter den Pflanzenproteinen pflegt man folgende Gruppen zu unterscheiden:

1) Albumine, löslich in Wasser und verdünnten neutralen Salzlösungen.
2) Globuline, unlöslich in Wasser, löslich in verdünnten neutralen Salzlösungen.
3) Prolamine, unlöslich in Wasser und verdünnten neutralen Salzlösungen, löslich in ca. 70 %-igem Alkohol.
4) Gluteline, unlöslich in obigen Lösungsmitteln, löslich in verdünnten Alkalien und Säuren.

Diese Gruppeneinteilung ist jedoch in mancher Hinsicht willkürlich, und die Grenzen zwischen den verschiedenen Gruppen sind mehr oder weniger verwischt. Die Tatsache, dass sich eine, aus einer Samenart isolierte Proteinfraktion, in eine der eben genannten Gruppen einordnen lässt, ist auch kein Kriterium,

dass man es mit einer definierten einheitlichen Substanz zu tun hat. Man muss vielleicht daran erinnern, dass schon Osborne hervorhob, obige Gruppeneinteilung sei in mancher Hinsicht unzufriedenstellend und inadaequat.

Vom proteinchemischen Standpunkt aus können verschiedene Samenarten eine stark variierende Zusammensetzung haben. Am häufigsten sind die Proteine, welche man nach obigem zu den Globulinen rechnen kann. Es mag erwähnt werden, dass Denis (*6*) 1859 auf die Tatsache aufmerksam machte, dass gewisse animalische und vegetabilische Proteine in neutralen, verdünnten Salzlösungen löslich sind. Aus vielen Samenarten kann man ferner eine Albuminfraktion isolieren. Ihre Menge ist doch oft gering, verglichen mit der Globulinfraktion. Die in Alkohol lösliche Prolaminfraktion ist für die Getreidearten charakteristisch, wie auch die Glutelinfraktion. Besonders diese letzte Proteingruppe dürfte doch äusserst inhomogen und nach der obigen Gruppeneinteilung vage definiert sein. (Vgl. (*20*).)

Gewisse Samenarten sind sehr globulinreich. Dies ist vor allem für einen Teil der ölreichen Samen der Fall, z. B. Hanfsamen. Aus dieser Samenart kan man relativ leicht das wohlbekannte Protein Edestin in kristallisiertem Zustand erhalten. Schon 1881 wurde dieses Protein von Ritthausen (*30*) kristallisiert erhalten. Das war aber nicht das erste Mal, dass ein vegetabilisches Protein kristallisiert wurde. 1858 gelang es Maschke (*21*) ein Eiweiss aus Paranüssen zu kristallisieren.

Edestin dürfte das meist studierte vegetabilische Globulin sein. In vielen Fällen erscheint es als Prototyp für ein Protein dieser Klasse. Deswegen wendete man den Namen Edestin mehr als einmal zur Bezeichnung für Globuline andern vegetabilischen Ursprungs an.

Svedberg und Stamm (*41*) untersuchten Edestin mit Hilfe der Ultrazentrifuge. Es zeigte sich hierbei, dass Edestin als ein einheitliches definiertes Produkt betrachtet werden kann. Nach späteren Untersuchungen von Polson (*28*) ist sein Molekulargewicht ca. 300 000.

Als andere globulinreiche Samenarten können Paranüsse und Mandeln genannt werden, aus denen die Globuline Excelsin und Amandin isoliert wurden. Auch sie untersuchten Svedberg und Sjögren in der Ultrazentrifuge (*40*). Sie fanden, dass Excelsin

und Amandin wie Edestin einheitliche Produkte sind. Ihr Molekulargewicht stimmt nahezu mit dem des Edestins überein (*28*).

Im Verhältnis zu diesen ölreichen Samen sind die stärkereichen Getreidearten verhältnismässig globulinarm. Die Weizenglobuline untersuchten Gortner, Hoffman und Sinclair (*8*, *9*). Sie extrahierten Weizenmehl mit verschiedenen Salzlösungen und fanden dabei, dass die »peptisierte» Proteinmenge in hohem Grad auf der Art und Konzentration der verwendeten Salzlösung beruhte. Speziell die Anionen bildeten eine deutliche Hofmeister-Serie. Mit 1-molaren Lösungen von KF, KCl, KBr und KJ konnten auf diese Art im Durchschnitt 13, 23, 36 und 64 % der Proteine des Weizenmehls extrahiert werden. Gortner, Hoffman und Sinclair heben hervor, dass man nicht von einem einheitlichen Protein sprechen kann, und sie erachten, dass die allgemein bräuchliche Definition für ein Globulin jeden Sinns entbehrt.

In einer späteren Arbeit zeigten Staker und Gortner (*33*), dass auch die salzlöslichen Proteine in einer Anzahl anderer Samen durch verschiedene Salzlösungen in ungleichem Grad extrahiert werden. Sie fanden u. a., dass das Verhältnis zwischen Proteinmengen, die mit 0,5-m KCl und 0,5-m KJ extrahiert wurden, für Gerste 0,855 ist, 0,628 für Hafer, 0,563 für Weizen, 0,987 für Paranüsse und 0,429 für Hanfsamen. Es kann in diesem Zusammenhang erwähnt werden, dass schon Osborne und Harris (*24*) die Löslichkeit des Edestins in NaJ und KJ doppelt so gross wie in den entsprechenden Chloriden fanden. Seine Löslichkeit in den Bromiden nahm eine Mittelstellung ein.

Wie vorhin erwähnt, sind die aus Hanfsamen, Paranüssen und Mandeln isolierten Globulinfraktionen mindestens im grossen und ganzen monodispers. Nach den Untersuchungen von Krejci und Svedberg (*13*) ist dies dagegen für die Globulinfraktion des Weizens nicht der Fall. Sie extrahierten Weizenmehl mit 0,5-m Lösungen von KF, KCl, KBr und KJ. Durch eine Serie Ultrazentrifugierungen der aus diesen Auszügen gewonnenen Globulinfraktionen konnten sie zeigen, dass die Globuline des Weizens in mehreren, verschiedenen Formen auftreten. Eine von diesen hatte nach der Sedimentationskonstante zu urteilen, ein dem Edestin, Excelsin und Amandin entsprechendes Molekulargewicht. Die übrigen Formen hatten sowohl höhere wie niedrigere Mole-

kulargewichte. Zum Teil waren sie möglicherweise $^1/_2$, 2 und 4 mal so hoch. Die damalige Untersuchungstechnik liess eine mehr detaillierte Analyse der komplizierten Mischungen nicht zu.

Krejci und Svedberg fraktionierten auch eine Globulinfraktion durch Zusatz von Ammoniumsulfat bis zu verschiedenen Sättigungsgraden. Sie gingen dabei von einem KCl-auszug aus Weizenmehl aus, das vorher schon mit KF ausgezogen war. Sie fanden dabei, dass die bei Halbsättigung des KCl-auszugs ausfallende Fraktion Globuline geringeren Molekulargewichts enthielt, als die durch vollständige Ammoniumsulfatsättigung der vorher halbgesättigten Lösung erhaltene Fraktion.

Gerste steht dem Weizen botanisch nahe, und in der Folge werden wir sehen, dass die Globulinfraktion der Gerste gleich wie die des Weizens nicht aus einem einheitlichen Produkt besteht, sondern aus einer Mischung verschiedener Molekülarten. Grob gesehen dürften die Gerstenglobuline als ein paucidisperses System, enthaltend Komponenten mit Molekulargewichten von einigen Zehntausend bis zu mehreren Hunderttausend betrachtet werden können.

Auch in vielen andern Fällen fand man, dass die aus einer bestimmten Samenart isolierte Globulinfraktion wahrscheinlich aus mehreren ungleichen Molekülarten besteht. So fanden Johns, Jones, Gersdorff u. a. (*11*), dass die salzlöslichen Proteine, z. B. von einer Anzahl Schotengewächsen (Erdnuss, Mungbohne, Limabohne u. a. m.) durch fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat in zwei Fraktionen aufgeteilt werden konnten. Die eine, α-Globulin, war in der Regel schon bei $^1/_4$-Sättigung ausgefällt, die andere, β-Globulin, dagegen fiel erst bei höherer Sättigung aus, gewöhnlich zwischen den Grenzen $^1/_2$- und $^3/_4$-Sättigung.

Es geht aus obiger Übersicht hervor, dass die aus einer gewissen Samenart isolierte Globulinfraktion bei weitem nicht immer als ein einheitliches Produkt betrachtet werden kann. Manches deutet jedoch darauf hin, dass diese uneinheitlichen Globulinfraktionen in vielen Fällen als ein im grossen und ganzen paucidisperses System aufgefasst werden können, eine Mischung relativ weniger in sich einheitlicher Komponenten enthaltend. Diese können sich nicht nur durch ungleiche Molekülgrösse von einander unterscheiden, sondern auch durch verschiedene Löslichkeit, elektrochemisches Verhalten etc. Für diese einheitlichen

Komponenten dürfte man die Bezeichnung Globuline gut beibehalten können.

Der Proteingehalt der Gerste variiert etwas mit der Art, Wachstumsverhältnissen, Reifungsgrad etc. In der Regel wird er zu 7,5 bis 13 % des Totalgewichts angegeben, also zu rund 10 %. Unter Proteingehalt versteht man da gewöhnlich den Stickstoffgehalt multipliziert mit dem Faktor 6,25. Der Hauptbestandteil der Gerste ist jedoch nicht Protein, sondern Stärke, deren Gehalt 50 bis 60 % des Totalgewichts beträgt. Je grösser der Stärkegehalt, desto geringer pflegt der Proteingehalt zu sein. Der Rest besteht zum grössten Teil aus Wasser, Zuckerarten, Zellulose, Fett, Pektin, Lignin und Salzen. Der Wassergehalt beträgt ca. 10 % und die Relativmenge jedes der übrigen Bestandteile rund einige Prozent. Irgend ein wesentlicher Unterschied zwischen 2-zeiliger und 6-zeiliger Gerste besteht nicht.

Ein Teil der Gerstenproteine sind in reinem Wasser löslich, ein anderer in verdünnten Neutralsalzlösungen und ein dritter in ca. 70 %-igem Alkohol. Ausserdem bleibt noch ein in diesen Lösungsmitteln unlöslicher Rest übrig, der aber mindestens teilweise in verdünnten Alkalien löslich ist. Nach der klassischen Einteilung der Pflanzenproteine würde Gerste also Albumin, Globulin, Prolamin und Glutelin enthalten. Stellt man die Frage, in welchen Mengenverhältnissen diese verschiedenen Proteine zueinander stehen, so bleibt die Antwort in gewisser Hinsicht unbestimmt. Das hängt damit zusammen, dass die klassische Gruppeneinteilung in sich selbst nicht vollständig eindeutig ist. In der Literatur vorkommende Angaben sind folglich ziemlich variierend, je nach den Bedingungen unter denen die Extraktion und Separation der in Frage stehenden Proteingruppe stattgefunden hat. Was die salzlöslichen N-Verbindungen betrifft, so könnte man als einen Mittelwert ihre relative Menge zu einem Viertel oder höchstens einem Drittel des totalen N-Gehalts ansetzen. Dieser Bruchteil umfasst da sowohl Albumin- wie Globulinfraktion. Die in 70 %-igem Alkohol lösliche Fraktion, enthaltend das Prolamin der Gerste, Hordein, wird in der Regel als ungefähr gleichgross wie die ebengenannte salzlösliche Fraktion angegeben. Bishop (*3*) der umfassende Untersuchungen an Gerstenproteinen durchführte, fand, dass das Mengenverhältnis der salzlöslichen N-Verbindungen (in diesem Fall die mit 5 % K_2SO_4-

lösung extrahierbaren) zu den in 70 %-igem Alkohol löslichen mit dem totalen N-Gehalt der Gerste variierte. War letzterer ungefähr 1,4 % (N × 6,25 = 8,75), so war das Verhältnis gleich 1. Mit höherem N-Gehalt wurde das Verhältnis kleiner als 1, bei kleinerem N-Gehalt grösser. Die Menge des Glutelinstickstoffs war praktisch unabhängig vom totalen Stickstoffgehalt und machte etwas mehr als ein Drittel desselben aus.

Die durch Salzlösung extrahierbaren N-Verbindungen bestehen z. T. aus niederen N-Verbindungen wie Polypeptiden und Aminosäuren. Wie gross dieser Anteil ist, und in welchem Mass man sich ihn durch Abbau aus den einheitlichen Proteinen unter dem Gang der Arbeit entstanden denken kann, ist nicht näher bekannt. Oft scheint man damit gerechnet zu haben, dass mindestens $^2/_3$ der salzlöslichen Fraktion aus Protein bestehen sollten. Diese Angabe muss jedoch als sehr grobe Näherung betrachtet werden.

Nach Sinclair (*31*) gehen variierende Mengen des Weizenprolamins Gliadin in Lösung, wenn man Weizen mit verschiedenen Salzlösungen wie 1-m KJ, KBr und KCl extrahiert. Von diesen soll KJ die grösste, KCl die geringste Gliadinmenge extrahieren. Da das Gerstenprolamin Hordein grosse Ähnlichkeit mit Gliadin aufweist, enthält möglicherweise auch der Salzauszug von Gerste in gewissen Fällen einen Teil von N-Verbindungen, die, wenn mit Alkohol extrahiert, unter dem Namen Hordein gehen.

Was das Verhältnis der Globulin- und Albuminmengen betrifft, so liegen die meist variierenden Angaben vor, was natürlich zu einem grossen Teil auf den ungleichen während der Extraktion und Separation herrschenden Bedingungen beruht. Nach Osbornes Untersuchungen (*22*) sollte die Globulinfraktion 6,5 mal so gross sein wie die Albuminfraktion, nach Bishop (*4*) sollte sie dagegen kleiner sein. Osborne extrahierte Gerste mit 10 %-igem NaCl, während Bishop 5 %-iges K_2SO_4 verwendete. In einer Zusammenstellung von Hopkins und Krause (*10*) findet sich eine Angabe, dass Gerste durchschnittlich 3,1 % Globulin und 0,4 % Albumin enthält.

Die Gerstenproteine spielen eine grosse Rolle im Brauprozess, und sie waren im Zusammenhang damit Gegenstand umfassender Untersuchungen von Schjerning, Windisch, Bishop, Hartong, Enders und andern. Diese und andere Untersuchungen waren

ohne Zweifel von grosser Bedeutung und lieferten wertvolle Beiträge zur allgemeinen Kenntnis der Gerstenproteine. Die spezielle Frage nach der näheren physikalisch-chemischen Natur der Globulinfraktion verblieb doch im grossen und ganzen ungelöst. So hat man beispielsweise nicht mit Sicherheit entscheiden können, ob die Globulinfraktion der Gerste ein mono-, pauci- oder polydisperses System ist.

Die Ursache dieser relativ begrenzten Kenntnis der Gerstenglobulinfraktion ist natürlich zu einem grossen Teil in der komplizierten Natur des Materials zu suchen. Teilweise dürfte sie aber auch in der Tatsache begründet sein, dass passende physikalisch-chemische Untersuchungsmethoden fehlten. Rein chemische Methoden sind ja hier nicht hinreichend, wegen der gleichartigen chemischen Zusammensetzung der Proteine.

* * *

Die vorliegende Untersuchung der Gerstenglobuline stellt ein Glied in einer Reihe von Arbeiten dar, die am physikalisch-chemischen Institut in Upsala mit Unterstützung von A.B. Stockholms Bryggerier ausgeführt wurden. Es ist von grossen Bedeutung für das Studium der verschiedenen Phasen des Brauprozesses, eine möglichst eingehende Kenntnis des Ausgangsmaterials zu haben, und hierbei hat man für die Globuline ein besonderes Interesse.

Eine Anzahl Proteine kommen in der Natur in Lösung vor. Die Gerstenglobuline dagegen liegen in fester Form vor und müssen in Lösung gebracht werden, bevor sie Gegenstand einer Untersuchung werden können, was natürlich gewisse Komplikationen mit sich bringt.

Schon in einem frühen Stadium der Untersuchung zeigte sich, dass die Gerstenglobuline ein System verschiedener Komponenten darstellen. Die Arbeit war also darauf eingerichtet, sie nach Möglichkeit zu isolieren und ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften zu untersuchen. Diese beiden Aufgaben sind ja miteinander intim verbunden; um die Komponenten zu isolieren, muss man in gewisser Hinsicht ihre Eigenschaften kennen, und um ihre Eigenschaften kennen zu lernen, müssen sie einigermassen

rein vorliegen. Das schrittweise Arbeiten zur Lösung dieser Aufgaben musste deshalb abwechslungsweise weitergeführt werden.

Der Verfasser hatte gegenüber früheren Forschern auf diesem Gebiet den grossen Vorteil, die Svedberg'sche Ultrazentrifuge anwenden zu können. Sie wurde sowohl zum Verfolgen der verschiedenen Stufen bei der Präparation, als auch zur Charakterisierung der Komponenten benützt.

Um eine Molekulargewichtsbestimmung von Komponenten in Mischungen ausführen zu können, wurde eine theoretische Behandlung dieser Frage durchgeführt.

Grundlagen der Ultrazentrifugierung.

Wegen der grossen Rolle, die die Ultrazentrifugierung in den Untersuchungen des Verfassers gespielt hat, dürfte es angebracht sein, hier eine kurzgefasste Übersicht über diese Methodik zu geben. Für eine eingehendere Beschreibung sei auf Svedberg und Pedersens Monographie verwiesen (*39*, *a*, *b*).

Die Ultrazentrifugierung gründet sich auf die Sedimentation von Molekülen in starken Zentrifugalfeldern. Durch Messung der Sedimentationsgeschwindigkeit kann die sogenannte Sedimentationskonstante bestimmt werden. Dies ist eine für jede Substanz charakteristische Konstante, und ihre Grösse beruht auf Masse und Form der Moleküle. Mit Hilfe der Sedimentationskonstante ist es möglich, das Molekulargewicht der in Frage stehenden Substanz zu bestimmen, was ja von grosser Bedeutung in der Proteinchemie ist. Das Molekulargewicht kann auch aus Daten einer Zentrifugierung bei relativ geringer Umdrehungszahl berechnet werden. Die Umdrehungszahl muss dabei so gewählt werden, dass sich ein günstiges Gleichgewicht zwischen Sedimentation und Diffusion einstellt. (Methode des Sedimentationsgleichgewichts.) In beiden Fällen ist die Kenntnis des spezifischen Volumens und im ersten auch der Diffusionskonstante der Substanz notwendig.

Die experimentelle Technik bei einer Ultrazentrifugierung lässt es zu, die Sedimentation der Moleküle während des Versuchs zu verfolgen. Dies geschieht mit Hilfe empfindlicher optischer Methoden. Eine von ihnen, die Lichtabsorptionsmethode, erlaubt die Konzentrationsbestimmung in verschiedenen Abständen von

der Rotationsachse. Eine andere Methode ist die von Lamm (*14*, *15*, *16*) entwickelte Refraktionsindexmethode (Skalenmethode), bei welcher man dem Konzentrationsgradienten proportionale Skalenstrichverschiebungen bestimmt. Bei der letztgenannten Methode ist das Auflösungsvermögen grösser als bei der ersten. Die Skalenmethode bietet folglich bessere Möglichkeiten, gleichzeitig verschiedene Molekülarten in einer Mischung während der Sedimentation zu verfolgen. Bei den Untersuchungen des Verfassers bestanden die untersuchten Systeme in der Regel aus komplizierten Mischungen verschiedener Molekülarten. Die Skalenmethode kam daher fast ausschliesslich zur Anwendung. Es kann vielleicht noch hinzugefügt werden, dass die Sedimentationskonstanten bei Anwendung der Skalenmethode meist genauer bestimmt werden können, und dass diese Methode unter gewissen Voraussetzungen die Konzentration der sedimentierenden Stoffe zu bestimmen erlaubt.[1]

Unter gewissen Bedingungen kann jedoch die Absorptionsmethode spezielle Vorteile bieten, nämlich dann, wenn der Stoff, dessen Sedimentation studiert werden soll, eine von den übrigen in der Mischung vorhandenen Stoffen verschiedene Lichtabsorption hat. So ist es z. B. möglich in einer Mischung von Proteinen und Kohlenhydraten die Sedimentation der Proteine allein zu verfolgen, dank der starken Absorption der Proteine im Ultravioletten. In einer Anzahl solcher Fälle machte der Verfasser von der Absorptionsmethode Gebrauch.

In der Folge werden eine Reihe wichtiger Formeln mitgeteilt, die der mathematischen Behandlung des bei der Ultrazentrifugierung erhaltenen Materials zugrunde liegen.

In erster Linie soll die Sedimentationskonstante s definiert werden (*37*).

Die Sedimentationskonstante s ist die bei einer Zentrifugierung beobachtetete Sedimentationsgeschwindigkeit dx/dt, reduziert auf die Einheit des Zentrifugalfelds und die Viskosität und Dichte des Wassers bei 20° C. Man kann die Sedimentationskonstante nach Gleichung (1) berechnen

[1] In den sogenannten Sedimentationsdiagrammen sind die Skalenstrichverschiebungen als Ordinate gegen den entsprechenden Abstand vom Rotationszentrum als Abszisse abgetragen. Die zwischen Kurve und Abszisse eingeschlossene Fläche ist der Substanzkonzentration proportional.

$$s = \frac{dx}{dt} \cdot \frac{1}{\omega^2 x} \cdot \frac{\eta_t}{\eta_{20}^0} \cdot \frac{1 - V_{20}\varrho_{20}^0}{1 - V_t \varrho_t}. \tag{1}$$

x = Abstand von der Rotationsachse,
ω = Winkelgeschwindigkeit des Rotors,
η_t = Viskosität des Lösungsmittels bei der während der Zentrifugierung herrschenden Temperatur $t°$ C,
η_{20}^0 = Viskosität des Wassers bei 20° C,
ϱ_t = Dichte des Lösungsmittels bei $t°$ C,
ϱ_{20}^0 = Dichte des Wassers bei 20° C,
V_t = spezifisches Volumen der gelösten Substanz im Lösungsmittel bei $t°$ C,
V_{20} = spezifisches Volumen des Gelösten im Lösungsmittel bei 20° C.

Die Sedimentationskonstante wird gewöhnlich in Einheiten von 10^{-13} c. g. s. angegeben. Dies wird auch in dieser Arbeit befolgt.

Für die Berechnung des Molekulargewichts M aus der Sedimentationskonstante s und der Diffusionskonstante D gilt folgende Gleichung (*35*, *37*)

$$M = \frac{R\,T\,s}{D(1 - V_{20}\,\varrho_{20}^0)} \tag{2}$$

wo R die Gaskonstante und T die absolute Temperatur bedeuten. Die übrigen Bezeichnungen haben die gleiche Bedeutung wie vorher.

Aus den Daten einer Gleichgewichtszentrifugierung kann das Molekulargewicht M nach den Gleichungen (*35*, *36*)

$$M = \frac{R\,T\,d\,c/d\,x}{(1 - V_t\,\varrho_t)\,\omega^2\,x\,c_x} \tag{3}$$

und

$$M = \frac{2\,R\,T \ln (c_2/c_1)}{(1 - V_t\,\varrho_t)\,\omega^2\,(x_2^2 - x_1^2)} \tag{4}$$

berechnet werden, wo c_x, c_1 und c_2 die Konzentration des Stoffes in den Abständen x, x_1 und x_2 von der Rotationsachse bedeuten.

Liegt eine Mischung verschiedener Molekülarten vor, so gelten (3) und (4) für jede in der Mischung vorkommende Molekülart. Die berechneten Werte von M stellen jedoch gewisse Mittelwerte dar (*18*). Wenn die Molekulargewichte in diesem Fall aus Daten,

entsprechend verschiedenen Lösungsschichten in der Zelle, in ungleichem Abstand von der Rotationsachse berechnet werden, bekommt man in den resultierenden Werten einen Gang. Sie wachsen mit dem Abstand von der Rotationsachse.

Wendet man die Lichtabsorptionsmethode an, so kann man c_2/c_1 aus experimentellen Daten bestimmen. Gleichung (4) kann folglich in diesem Fall direkt der Berechnung des Molekulargewichts einer einheitlichen Substanz zugrunde gelegt werden.

Um aus den Skalenstrichverschiebungen bei der Skalenmethode das Konzentrationsverhältnis c_2/c_1 zu berechnen, kann man nach Lamm (*15*) für einen monodispersen, die Gasgesetze befolgenden Stoff

$$\frac{c_2}{c_1} = \frac{Z_2 x_1}{Z_1 x_2} \tag{5}$$

setzen, wo Z_1 und Z_2 die Skalenstrichverschiebungen in den Abständen x_1 und x_2 von der Rotationsachse sind. Gleichung (4) kann dann für die Berechnung des Molekulargewichts angewendet werden.

Die Möglichkeiten, aus Daten von Gleichgewichtszentrifugierungen einer Mischung das Molekulargewicht eines bestimmten in der Mischung vorhandenen Stoffes zu berechnen, sollen später behandelt werden. (Siehe S. 68.)

Die grosse Bedeutung der Ultrazentrifugierung liegt nicht nur in der Möglichkeit begründet, charakteristische Konstanten eines gewissen Stoffes zu bestimmen. Sie erlaubt auch eine Analyse von Mischungen hochmolekularer Stoffe vorzunehmen. Die verschiedenen Molekülarten treten nämlich in den zu verschiedenen Zeitpunkten aufgenommenen Sedimentationsdiagrammen jede für sich hervor. Die analytischen Möglichkeiten, die sich hierbei bieten, sind von grossem Wert z. B. bei präparativen Arbeiten, wo es gilt, aus einer Mischung bestimmte Molekülarten zu isolieren. Hierbei ist es von besonderem Vorteil, dass die Analyse ohne chemische Eingriffe möglich ist. Diese leiten nämlich oft zu einer durchgreifenden Veränderung des zu untersuchenden Systems.

2—42197. *Olof Quensel.*

KAP. I.

Präparationsmethoden.

Orientierende Versuche.

Bei der Extraktion von Gerste mit einer Salzlösung erhält man einen Auszug, der neben N-Verbindungen noch andere lösliche Bestandteile, hauptsächlich Kohlenhydrate, enthält. In den vom Verfasser untersuchten Auszügen belief sich der Anteil der N-Verbindungen auf ungefähr die Hälfte sämtlicher extrahierter Stoffe. In der Folge wird zuerst kurz über eine Anzahl orientierender Versuche über die salzlöslichen N-Verbindungen der Gerste berichtet. (Vgl. auch (*29*).)

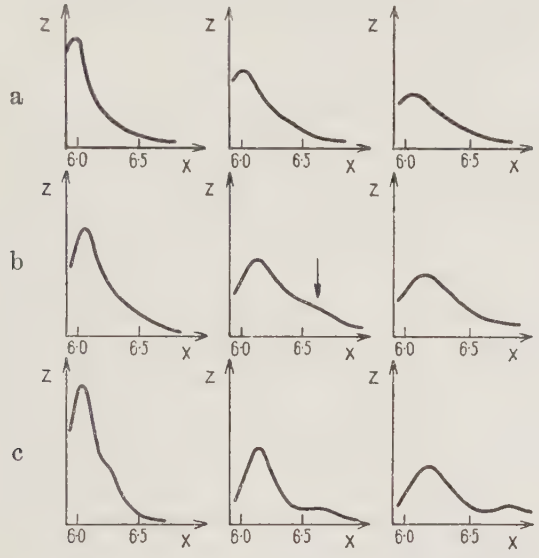
Unbehandelte Auszüge.

Als Ausgangsmaterial wurde feingemahlenes Mehl von zweizeiliger schwedischer Malzgerste (Kenia), verwendet, die durch A. B. Stockholms Bryggerier vermittelt wurde. Man extrahierte unter langsamen Umrühren im Kühlraum bei einer zwischen 0° und + 4° C liegenden Temperatur. Die Extraktionszeit variierte von einigen Stunden bis zu einigen Tagen, in der Regel betrug sie doch ungefähr 12 Stunden. Auf ein Gramm Gerstenmehl kamen drei bis vier ml Extraktionsmittel. Etwas Toluol wurde zugegeben. Als Extraktionsmittel kamen u. a. 0,2-, 1- und 2-molare Lösungen von NaCl und 0,2-molare Lösungen von NaBr und NaJ zur Anwendung. In einer Anzahl Fälle nahm man die Extraktion mit 1-m NaCl-lösungen vor, die ausserdem primäres und sekundäres Phosphat in verschiedenen Verhältnissen enthielten. Das pH des Extrakts variierte demzufolge zwischen etwa 5,5 und 7,5. Das pH des ungepufferten Extrakts war ungefähr 6.

Nach der Extraktion zentrifugierte man den ungelösten Rückstand des Mehls in einer Laboratoriumszentrifuge ab. Um dann die Lösungen klar zu erhalten, saugte man sie durch einen Büchnertrichter ab, in dem sich eine Schicht von zusammengepresstem, fein zerrissenem und mit Extraktionsmittel durchtränk-

tem Filtrierpapier befand (*1*). Um vollständig klare Lösungen zu erhalten, erwies sich diese Methode bei den Arbeiten des Verfassers besonders effektiv.

Ultrazentrifugierungen zeigten, dass das mit verschiedenen Salzlösungen extrahierte Material immer in hohem Grad polydis-



Figur 1.

a) Sedimentationsdiagramm eines unbehandelten Gerstenauszugs. Extraktionsmittel 1-m NaCl.

b) Sedimentationsdiagramm des Auszugs nach 1-wöchiger Dialyse gegen das Lösungsmittel (1-m NaCl).

c) Sedimentationsdiagramm einer bei der Ausfällung des Auszugs durch vollständige Sättigung mit Ammoniumsulfat erhaltenen Fällung nach Auflösung und Dialyse gegen das Lösungsmittel.

In den in diesen und den folgenden Bildern enthaltenen Sedimentationsdiagrammen stammen die drei angewendeten Kurven von Exponierungen, aufgenommen 15, 35 und 55 Minuten nach dem Erreichen der vollen Umdrehungszahl (68 000—69 000 Umdrehungen/Minute, Zentrifugalfeld ca. 340 000 × g.) Die Sedimentationsrichtung verläuft von links nach rechts. x bezeichnet den Abstand von der Rotationsachse, ausgedrückt in cm. Z bezeichnet die Skalenstrichverschiebung und ist für jede Zentrifugierung in der gleichen Einheit ausgedrückt.

pers war. Die durchschnittliche Sedimentationskonstante der in der Mischung vorhandenen Molekülarten war sehr niedrig, gewöhnlich kleiner als 1. Wegen der komplizierten Zusammensetzung des Auszugs war es nicht möglich, ihn mit Hilfe der bei den Zentrifugierungen erhaltenen Sedimentationsdiagramme näher zu untersuchen. Soviel war doch klar, dass der überwiegende Teil der im Auszug vorhandenen Molekülarten ein

wesentlich kleineres Molekulargewicht als die Proteine haben musste.

Bei den meisten Zentrifugierungen wurde die Sedimentation mit Hilfe der Skalenmethode verfolgt, die ja für das Studium von Mischungen besonders geeignet ist. In den dabei erhaltenen Sedimentationsdiagrammen konnten jedoch keine deutlichen Maxima festgestellt werden, von denen man hätte denken können, sie rührten von einheitlichen Proteinen her. (Siehe Fig. 1 a.) Solche können jedoch sehr wohl in den Mischungen vorhanden gewesen sein, doch dann in so geringen Konzentrationen, dass ihre Anwesenheit durch die grosse Menge uneinheitliches Material verdeckt wurde. In den Fällen, wo die Skalenmethode zur Anwendung kam, kann man sich denken, die beobachtete Polydispersität sei sowohl durch stickstoffhaltige wie stickstoffreie Stoffe bedingt gewesen. Da, wie eben erwähnt, die Konzentration der Stickstoffverbindungen von der gleichen Grössenordnung war wie die der übrigen im Auszug vorhandenen Stoffe, dürfte der Schlussatz gezogen werden, dass die beobachtete Polydispersität mindestens teilweise durch die Uneinheitlichkeit der stickstoffhaltigen Fraktion bedingt war. Eine Anzahl Zentrifugierungen mit der Lichtabsorptionsmethode stützten diese Annahme.

Die bei verschiedenen Versuchen erhaltenen Sedimentationsdiagramme hatten im grossen und ganzen dasselbe Aussehen. Irgendwelche Unterschiede, die man mit der Wahl des Extraktionsmittels etc. hätte in Beziehung setzen können, waren nicht festzustellen.

Dialysierte Auszüge.

Die mit verschiedenen Extraktionsmitteln erhaltenen Auszüge dialysierte man gegen das Extraktionsmittel in Cellophansäcken bei ungefähr $+4^{\circ}$ C. Durch die Dialyse wurde ein Teil der niedermolekulareren Stoffe entfernt und das Gelöste dadurch einheitlicher. Dies ging aus Ultrazentrifugierungen der dialysierten Extrakte hervor. So stieg die durchschnittliche Sedimentationskonstante in einer Anzahl Fälle sogar über 2, und die Gradientenkurve in den Sedimentationsdiagrammen durchlief ein weniger flaches Maximum. Bei der Dialyse wurden in erster Linie die nicht stickstoffhaltigen Bestandteile entfernt. Nach

hinreichend langer Dialyse sank ihre Konzentration auf ungefähr $^1/_{10}$ von der der Stickstoffverbindungen.

Die Gradientkurven waren immer mehr oder weniger asymmetrisch, und auf dem rechts vom Gipfel gelegenen Teil konnte man oft eine deutliche Ausbuchtung wahrnehmen, die das Vorhandensein von Substanzen andeuteten, die höhere Sedimentationskonstanten besassen, als die in der uneinheitlichen Hauptmasse enthaltenen Komponenten. In der Figur 1 b sind einige Sedimentationsdiagramme wiedergegeben, die man bei der Zentrifugierung eines Gerstenextrakts erhielt, der während einer Woche in Cellophansäcken gegen das Lösungsmittel (1-m NaCl) dialysiert worden war. Die durch die höhermolekulareren Stoffe verursachte Ausbuchtung ist mit einem Pfeil markiert. In diesem und vielen andern Fällen war jedoch die relative Konzentration dieser hochmolekularen Stoffe so klein, dass ein näheres Studium ihrer Sedimentation in Gegenwart der uneinheitlichen Hauptmasse ausgeschlossen war. Es ist doch anzunehmen, dass diese Ausbuchtung zum mindesten teilweise durch eines oder mehrere der Globuline verursacht war, die später in dieser Arbeit behandelt werden.

Gefällte und dialysierte Auszüge.

Bei der fortgesetzten orientierenden Untersuchung über die in wässerigen Salzlösungen löslichen Stickstoffverbindungen der Gerste, fällte man eine Reihe von Salzauszügen durch Sättigung mit Ammoniumsulfat. Als Extraktionsmittel kamen die Salzlösungen zur Anwendung, die oben im Zusammenhang mit den Untersuchungen über die unbehandelten Auszüge erwähnt wurden. Die Fällungen wurden mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung gewaschen und darauf in einer Salzlösung, gewöhnlich in einer gepufferten 1-m NaCl-lösung aufgelöst, deren pH 7,0 war. In einer Anzahl Fälle wiederholte man diese Prozedur, maximal wurden drei Umfällungen vorgenommen. Nach jeder Umfällung untersuchte man die aufgelösten Fällungen in der Ultrazentrifuge, sowohl unmittelbar als auch nach verschieden langer Dialyse gegen das Lösungsmittel.

Die auf diese Weise erhaltenen Lösungen waren durchgehend einheitlicher, als die durch Dialyse der ursprünglichen Auszüge

gewonnenen. Aber andererseits war es klar, dass diese Operationen allein keine nur eine geringe Zahl einheitlicher Proteine enthaltende Lösungen liefern konnten. Die Polydispersität war immer noch beträchtlich. Die durchschnittliche Sedimentationskonstante für die Hauptmasse der in diesen Lösungen enthaltenen Molekülarten war jedoch oft höher als in den nur durch Dialyse gereinigten. In einer Anzahl Fälle erreichte sie ungefähr 2,5, entsprechend einem durchschnittlichen Molekulargewicht von einigen Zehntausenden.

Die Ausbuchtungen an den Gradientkurven, die schon in den dialysierten Auszügen das Vorhandensein höhermolekularer Stickstoffverbindungen andeuteten, traten in den umgefällten und dialysierten Auszügen noch mehr hervor. In einigen Fällen durchlief die Gradientkurve sogar ein zweites kleineres Maximum. (Siehe Fig. 1 c.) Die Sedimentationskonstante hatte nach approximativen Berechnungen einen zwischen 6 und 8 gelegenen Wert, entsprechend einem Molekulargewicht von etwa ein oder zwei Hunderttausenden.

Bei der Untersuchung der gefällten und wieder umgefällten Produkte zeigte sich, dass hauptsächlich die erste Ausfällung eine wesentliche Reinigung mit sich führte. Bei der Dialyse nahm, wie erwartet, die Menge niedermolekulareren Materials mit erhöhter Dialysenzeit ab. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen war doch der Unterschied von ein und drei Wochen Dialysendauer relativ unbedeutend. Der Kohlenhydratgehalt in den durch Ammoniumsulfatfällung und Dialyse erhaltenen Lösungen war geringer als in den durch Dialyse allein gewonnenen. Er betrug nur einige Prozent des Gehalts an Stickstoffverbindungen. Der Kohlenhydratgehalt wurde mit Hilfe der Orcinolmethode bestimmt (*43*, *32*).

Fraktionierung durch Dialyse.

Aus den Lösungen, die man bei der Extraktion von Samenkörnern mit Salzlösungen erhält, können die Globuline durch die Verminderung des Salzgehaltes in der Lösung ausgefällt werden und dadurch von andern N-Verbindungen, z. B. Albuminen, getrennt werden. Die Fällung kann dann in einer

passenden Salzlösung aufgelöst werden. Die für die Ausfällung der Globuline nötige Verminderung des Salzgehaltes kann man durch Verdünnung oder Dialyse erreichen. (Eventuell Elektrodialyse.)

Die erste Methode, die Verdünnung, ist wegen der manchmal äusserst unvollständigen Ausfällung nur in begrenztem Masstab angewendet worden. Ausserdem erhält man oft grosse Volumina, die die experimentelle Arbeit beträchtlich erschweren. In einer Anzahl spezieller Fälle kann doch die Methode mit Vorteil angewendet werden, z. B. bei der Ausfällung von Edestin aus Salzextrakten von Hanfsamen. Für die Ausfällung der Gerstenglobuline erwies sich die Methode dagegen als unzufriedenstellend.

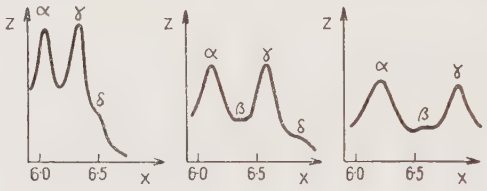
Bei der andern Methode, der Dialyse, erhält man in der Regel eine bedeutend mehr vollständige Ausfällung der Globuline, natürlich unter der Voraussetzung, dass die Dialyse genügend weit getrieben wird. Diese Methode hat eine grosse praktische Bedeutung erlangt. Sind die Auszüge globulinreich, können sie oft direkt dialysiert werden, sind sie dagegen globulinarm, so kann es von Vorteil sein, vor der Dialyse eine Erhöhung der Globulinkonzentration anzustreben. Dies geschieht gewöhnlich durch Sättigung der Auszüge mit Ammoniumsulfat, worauf man die Fällung in einem kleineren Volumen auflöst. Die Auszüge können auch durch Ultrafiltrierung konzentriert werden, wobei z. B. Cellophan als Filter verwendet wird.

Die Dialysenmethode verwendete man zur Ausfällung der Gerstenglobuline aus den Auszügen, und es erwies sich als vorteilhaft, die Lösungen vor der Dialyse nach einem der obigen Verfahren zu konzentrieren. Löste man die bei weitergetriebener Dialyse erhaltene Globulinfällung auf und untersuchte sie in der Ultrazentrifuge, so konnte man vier definierte Komponenten wahrnehmen. Diese bezeichnete man, nach steigenden Sedimentationskonstanten geordnet, mit α, β, γ und δ.

In der Figur 2 sind einige Sedimentationsdiagramme von einer Zentrifugierung einer solchen Globulinfraktion wiedergegeben. Zwei Komponenten, α und γ, sind vorherrschend und ungefähr zu gleichem Anteil vorhanden, während β und δ in bedeutend geringerer Menge vorkommen. Im gewählten Beispiel extrahierte man Gerstenmehl mit einer 1-m NaCl-lösung. Den Auszug fällte man durch Sättigung mit Ammoniumsulfat, und

die dabei erhaltene Fällung löste man wieder in einer 1-m NaCl-lösung. Die Dialyse wurde bei ungefähr + 4° C in Cellophansäcken gegen destilliertes Wasser ausgeführt, und sie wurde so lange fortgesetzt, bis durch Silbernitrat keine Chloridionen mehr nachgewiesen werden konnten. Die entstandene Fällung löste man schliesslich in 0,2-m Phosphatpuffer auf, dessen pH 7,0 war.

Sedimentationsdiagramme vom in Figur 2 wiedergegebenen Typus erhielt man auch, wenn man bei der ersten Extraktion andere Salzlösungen verwendete, z. B. die schon oben im Zusammenhang



Figur 2.
Sedimentationsdiagramme einer durch weitgetriebene Dialyse gegen destilliertes Wasser erhaltenen Globulinfraktion. Die vier Globulinkomponenten α, β, γ und δ können alle wahrgenommen werden.

mit der Untersuchung unbehandelter Auszüge erwähnten. (Siehe S. 18.) Die gleichen Verhältnisse fand man sowohl bei der direkten Dialyse der ursprünglichen oder durch Ultrafiltration konzentrierten Auszüge, als auch ohne vorhergehende Fällung mit Ammoniumsulfat. Kleinere Variationen in den Mengenverhältnissen der Komponenten kamen natürlich vor, was auf den ungleichen Versuchsbedingungen in den verschiedenen Stadien der Präparation beruht. Es soll erwähnt werden, dass β und δ in den Sedimentationsdiagrammen oft schwer nachzuweisen waren. Oft konnte man sie erst mit fortschreitender Globulinfraktionierung wahrnehmen. Nach den Sedimentationsdiagrammen zu urteilen enthielten die durch Dialyse erhaltenen Globulinfraktionen auch einen Teil uneinheitlichen Materials mit sowohl kleineren als auch grösseren Molekulargewichten als die in der Lösung vorhandenen Globulinkomponenten. Dies dürfte eine Ursache gewesen sein, dass die in kleinen Konzentrationen vorhandenen β- und δ-Komponenten in den Sedimentationsdiagrammen so undeutlich hervortraten.

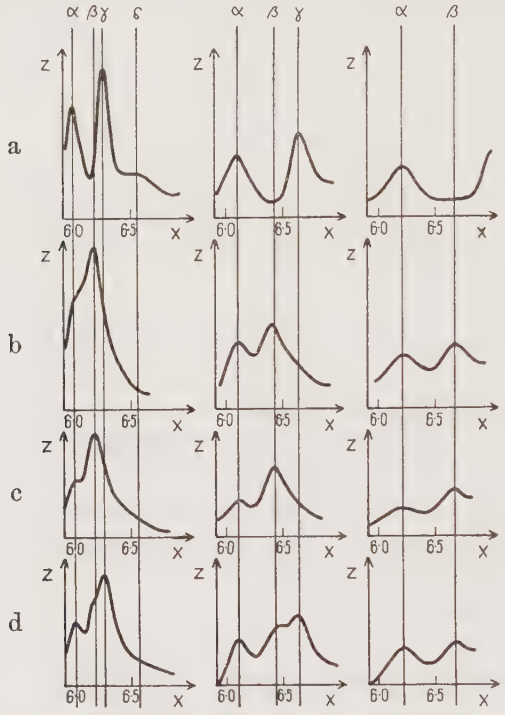
In allen oben erwähnten Versuchen dialysierte man die Lösungen in Cellophansäcken gegen langsam strömendes destillier-

tes Wasser bei ungefähr + 4° C. Bei der Dialyse von Auszügen, die man durch Fällung mit Ammoniumsulfat oder Ultrafiltration konzentriert hatte, erhielt man unter den angegebenen Versuchsbedingungen eine deutliche Globulinfällung während des ersten Tags der Dialyse, und während einer Woche oder etwas länger wuchs die Menge des Ausgefällten. Eine Beobachtung, die man bei diesen Dialysen machen konnte, leitete zu einem Verfahren, der fraktionierten Dialyse, durch das es zum ersten Mal möglich wurde, β-reiche Globulinlösungen zu gewinnen. Nach drei bis fünf Tage dauernder Dialyse war die zuerst entstandene Fällung zum grössten Teil auf den Boden der Dialysiersäcke gesunken oder hatte sich an ihren Wänden abgesetzt, und es sah aus, als ob die Fällung aufhören würde. Setzte man die Dialyse noch ein paar Tage länger fort, schien die Lösung jedoch wieder trüber geworden zu sein. Man bekam dadurch den Eindruck, die Ausfällung der Globuline gehe in zwei Etappen vor sich, eine deutliche Grenze konnte doch nicht wahrgenommen werden. Diese stufenweise Ausfällung deutete auf eine mit der Salzkonzentration auf ungleiche Weise variierende Löslichkeit der verschiedenen Gerstenglobuline hin. Eine Anzahl von Versuchen wurden daher durchgeführt, um die Möglichkeit einer Trennung durch fraktionierte Dialyse zu untersuchen.

In den ersten Versuchen unterbrach man die Dialyse, wenn die Ausfällung zum ersten Mal aufzuhören schien. Die dann ausgefallene Globulinfraktion trennte man in einer Laboratoriumszentrifuge ab, wusch sie mit destilliertem Wasser aus und löste sie in einer Salzlösung. In der gleichen Weise behandelte man die nach fortgesetzter Dialyse der Ausgangslösung gewonnene Fraktion.

Die bei der Ultrazentrifugierung der aufgelösten Fraktionen erhaltenen Sedimentationsdiagramme zeigten, dass beide Fraktionen zur Hauptsache zwei Komponenten enthielten. (Siehe Fig. 3, a und b.) Die langsamer sedimentierende Komponente schien in beiden Fraktionen gleich zu sein. Ihre Sedimentationskonstante war ca. 2,5, was mit dem aus früheren Versuchen für die α-Komponente erhaltenen Wert übereinstimmte. Die schneller sedimentierende Komponente hatte in der zuerst ausgefallenen Fraktion die Sedimentationskonstante 8—8,5, das gleiche, was man früher für die γ-Komponente fand. In der durch fortge-

setzte Dialyse erhaltenen Fraktion hatte die schneller sedimentierende Komponente die Sedimentationskonstante 6—6,5. Sie schien mit der früher beobachteten β-Komponente identisch zu sein. Deren Sedimentationskonstante hatte wegen ihrer niedrigen



Figur 3.

Sedimentationsdiagramme von Globulinfraktionen, erhalten bei stufenweiser Dialyse und bei Fällung mit CO_2.

a) Globulinfraktion, erhalten durch Auflösung des bei der Dialyse zuerst abgeschiedenen Materials.

b) Globulinfraktion, erhalten bei der Auflösung der bei fortgesetzter Dialyse entstandenen Fällung nach Abtrennung obiger Fällung.

c) und d) Bei der Fällung mit CO_2 erhaltene Fraktionen, nachdem die durch Dialyse bis $1{,}1 \cdot 10^{-4}$, resp. $17 \cdot 10^{-4}$ $Ohm^{-1} \cdot cm^{-1}$ erhaltenen Fällungen abgetrennt waren.

Die dünnen vertikalen Linien bezeichnen die ungefähre Lage der Grenzflächen für die verschiedenen Komponenten im Zeitpunkt der entsprechenden Exponierung.

Konzentration nicht genau bestimmt werden können, aber ihr Wert lag ungefähr zwischen 6 und 7. Die vorher beobachtete δ-Komponente war vermutlich in der ersten Fraktion enthalten. In dieser konnte man nämlich verschiedentlich eine Komponente

aufspüren mit einer Sedimentationskonstante 11—13, was mit der approximativ bestimmten Sedimentationskonstante für δ übereinstimmte.

Die Löslichkeit eines Globulins in einer Salzlösung beruht nicht nur auf der Art und der Konzentration des Salzes, sondern auch auf dem pH der Lösung. Am isoelektrischen Punkt pflegt die Löslichkeit ein mehr oder weniger scharf markiertes Minimum zu durchlaufen. Liegt der isoelektrische Punkt vom Neutralpunkt aus im sauren Gebiet, was gewöhnlich der Fall ist, so kann man durch Senken des pH bei der Dialyse eine vollständigere Ausfällung der Globuline erhalten. Ein bequemes Mittel, um das zu erreichen, besteht im Einleiten von Kohlensäure. Diese Möglichkeit wurde schon seit langem ausgenützt.

Anstatt die zweite, β-reiche, Globulinfraktion durch verlängerte Dialyse auszufällen, machte man nun den Versuch, durch Einleiten von Kohlensäure ans Ziel zu gelangen. Es zeigte sich, dass man bei den vorliegenden niederen Salzgehalten eine sehr starke Ausfällung erhielt. Diese konnte in einer gepufferten Salzlösung vom pH 7,0 vollständig aufgelöst werden.[1]

Die auf diese Weise gewonnenen Globulinfraktionen stimmten bei der Ultrazentrifugierung gut mit den bei fortgesetzter Dialyse erhaltenen überein. (Vgl. Fig. 3, b und c.) Es waren zwei Hauptkomponenten vorhanden, deren Sedimentationskonstanten denen der α- und β-Komponenten gleich waren. Die relative Konzentration von β war doch in der Regel grösser bei der Ausfällungen mit Kohlensäure, und diese Methode ist bequemer als die fortgesetzte Dialyse.

Welche Methode man auch zur Trennung von β und γ anwenden mag, so ist es natürlich von grosser Bedeutung, die erste Dialyse im richtigen Moment abzubrechen. Es ist schwer und wenig rationell, den richtigen Zeitpunkt für den Abbruch der Dialyse einzig durch Beobachten der fortschreitenden Globulin-

[1] Gewöhnlich wählte man eine Salzlösung, die 0,2-m an NaCl, 0,03-m und 0,02-m an Na_2HPO_4 resp. NaH_2PO_4 war und ein pH von 7,0 hatte. Dieses Lösungsmittel wurde in den Untersuchungen des Verfassers über die Gerstenglobuline mit Ausnahme einiger Spezialfälle angewendet, und wird in der Folge als Standardpuffer bezeichnet. Dass eine relativ so niedrige NaCl-Konzentration wie 0,2-molar gewählt wurde, trotz der grösseren Löslichkeit der Globuline bei höheren Salzgehalten, beruht auf zentrifugentechnischen Gründen.

ausfällung feststellen zu wollen. Um eine objektive Grundlage zur Beurteilung zu bekommen, wurden eine Anzahl Versuche durchgeführt, bei denen die Dialyse unterbrochen wurde, wenn die spezifische Leitfähigkeit $\varkappa$ auf einen bestimmten Wert gesunken war. Als Ausgangsmaterial für diese Versuche verwendete man Gerstenextrakte, die vor der Dialyse durch Ultrafiltrierung 3—4 Mal konzentriert waren. Das Gerstenmehl extrahierte man mit einer gepufferten Kochsalzlösung, 1-m NaCl, 0,06-m Na_2HPO_4 und 0,04-m NaH_2PO_4, pH = 7,0. Die Versuche zeigten, dass man, zur bestmöglichen Trennung der β- und γ-Komponenten, die Dialyse abbrechen soll, wenn die Leitfähigkeit auf ungefähr 10^{-4} $Ohm^{-1} \cdot cm^{-1}$ gesunken ist, was fast genau der Leitfähigkeit einer 0,001-m NaCl-lösung entspricht. Lässt man die Dialyse weiter gehen, riskiert man, dass auch ein grosser Teil von β ausfällt. Bricht man dagegen zu früh ab, z. B. wenn $\varkappa$ auf ungefähr 10^{-3} $Ohm^{-1} \cdot cm^{-1}$ gesunken ist, so enthält die β-reiche Fraktion auch beträchtliche Mengen γ. (Siehe Fig. 3 d.)

Die obigen Versuche geben das wichtige Resultat, dass man durch passend geleitete Dialyse allein eine weitgehende Trennung von β und γ erreichen kann. Man kann doch nicht damit rechnen, dass die β-reiche Fraktion hierbei vollständig frei von γ werden soll oder umgekehrt.

Während des ersten Teils der Dialyse fällt verhältnismässig mehr γ als α. Durch Abbrechen der Dialyse bei relativ hohen Salzgehalten kann man daher eine Globulinfraktion gewinnen, in der das Verhältnis der Konzentrationen von γ und α grösser ist, sowohl als in der Ausgangslösung, wie auch als in der Fraktion, die bei fortgesetzter Dialyse ausfällt. Die Konzentrationsverschiebungen sind jedoch nicht so gross, dass man durch eine fraktionierte Dialyse eine näherungsweise gleich weit gehende Trennung von α und γ erreichen könnte, wie für β und γ.

In diesem Zusammenhang sollen in Kürze eine Anzahl Versuche berührt werden, bei denen man eine in 1-m NaCl-lösung gelöste Globulinfraktion gegen NaCl-lösungen geringerer Konzentration dialysierte. Die ursprüngliche Lösung enthielt hauptsächlich γ und α im Verhältnis 2 : 3. In einem Versuch dialysierte man diese Lösung gegen eine 0,2-m NaCl-lösung. Die erhaltene Fällung löste man wieder in einer 1-m NaCl-lösung,

wobei doch ein geringer Teil ungelöst zurückblieb.[1] Eine Ultrazentrifugierung der aufgelösten Fällung zeigte, dass sie reich an γ war. Das Verhältnis der Konzentrationen der γ- und α-Komponenten war ungefähr wie 2 : 1. In der dialysierten Lösung war dagegen das genannte Konzentrationsverhältnis kleiner als in der ursprünglichen Lösung, d. h. ungefähr 1 : 3. Bei Dialyse gegen Salzlösungen geringerer Konzentration, von 0,1 bis 0,01-m, zeigten die entsprechenden Zentrifugierungen, dass auch α in immer stärkerem Mass auszufallen begann, und je geringer der Salzgehalt wurde, desto mehr näherte sich das Konzentrationsverhältnis von γ- und α-Komponente dem Wert, den es in der ursprünglichen Lösung hatte.

Eine Serie Dialyseversuche wurden ausgeführt, wo man anstatt des Salzgehaltes das pH variierte durch Verwendung verschiedener Puffer als Aussenflüssigkeiten.[2] Die Ausgangslösungen enthielten hauptsächlich α und γ und kleine Quantitäten β und δ. Was die α- und γ-Komponenten betrifft, so zeigte sich, dass in erster Linie die γ-Komponente ausfiel, wenn man das pH der Lösung gegen die saure Seite verschob. Der Trennungsgrad, der in diesem Fall erhalten werden konnte, war im grossen und ganzen mit dem bei der Dialyse gegen verdünnte NaCl-lösungen vergleichbar. Auch bei diesem Versuch erhielt man einen gewissen Rest, wenn man die Fällung wieder in einer Salzlösung in Lösung bringen wollte, speziell bei der Dialyse gegen Lösungen mit niederen pH-Werten. Soweit es möglich war, bei diesen Versuchen β und δ zu studieren, zeigte sich, dass sie in der Regel am deutlichsten in den aufgelösten Fällungen hervortraten, was andeutete, dass die Löslichkeit dieser Komponenten relativ stark pH-abhängig war.

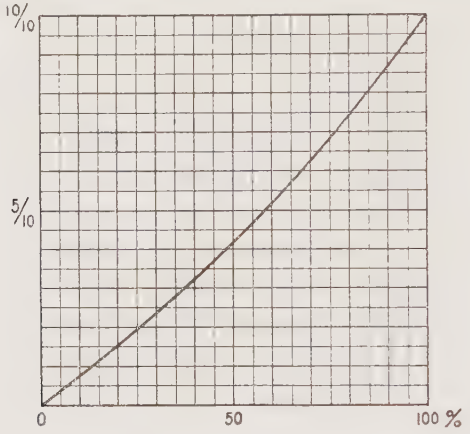
---

[1] Wenn die Gerstenglobuline mittels Dialyse ausgefällt werden, so kann meistens ein kleiner Teil im ursprünglichen Lösungsmittel nicht wieder aufgelöst werden. Diese Form von Denaturierung ist jedoch nicht speziell für die Gerstenglobuline charakteristisch.

[2] Nach elektrophoretischen Bestimmungen, die später behandelt werden (siehe S. 62), liegen die isoelektrischen Punkte der α-, β- und γ-Komponenten bei pH 5,00, 4,90 und 5,70.

Fraktionierung durch Fällung mit Ammoniumsulfat.

Bei der Ausfällung von Proteinlösungen mit Ammoniumsulfat wird der Sulfatgehalt gewöhnlich als Sättigungsgrad angegeben. Dieser Ausdruck wird in der Literatur auf zwei nicht übereinstimmende Arten definiert. Nach der ersten Definition ist der Sättigungsgrad dem Verhältnis zwischen dem zugesetzten Volumen gesättigter Ammoniumsulfatlösung und dem nach dem Zusatz erhaltenen Endvolumen gleich. Nach der andern Definition ist es das Verhältnis zwischen der zugesetzten Menge festen



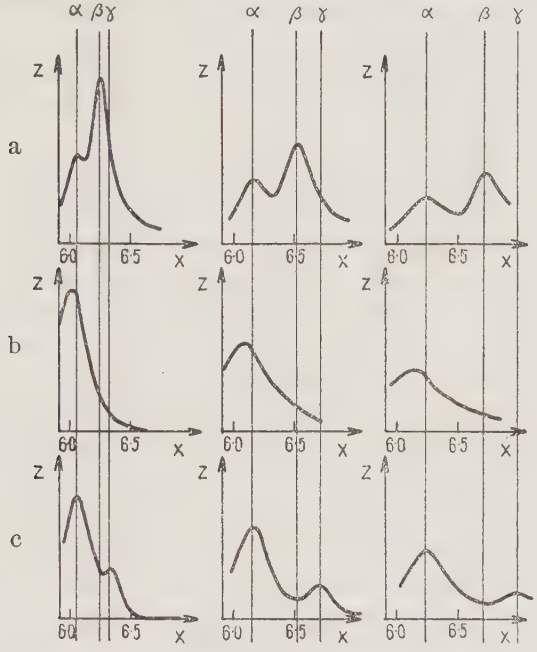
Figur 4.
Beziehung zwischen Sättigungsgrad nach der vom Verfasser angewendeten Definition und ausgedrückt im Prozentgehalt gesättigter Ammoniumsulfatlösung im Endvolumen.

Ammoniumsulfats und der Menge, die man zur Sättigung der Lösung zusetzen müsste. In der Arbeit des Verfassers ist der Sättigungsgrad immer in der letztgenannten Weise ausgedrückt. Um einen Vergleich zu erleichtern berechnete man die Beziehung, die zwischen den beiden auf obige Art definierten Sättigungsgraden besteht. Diese Beziehung ist in Figur 4 graphisch wiedergegeben. Bei dieser Berechnung verwendete man folgende Daten: Zur Sättigung müssen 1 000 ml Lösung mit 760 Gramm Ammoniumsulfat versetzt werden. 1 000 ml gesättigte Ammoniumsulfatlösung enthalten 540 Gramm Salz bei Raumtemperatur.

Versetzt man einen Salzextrakt von Gerste mit Ammoniumsulfat, so beginnen die Stickstoffverbindungen schon auszufallen,

bevor 1/10-Sättigung erreicht ist. Bei der Erhöhung des Salzgehaltes bekommt man eine fortgesetzte sukzessive Ausfällung, bis die Lösung nahezu gesättigt ist.

Durch fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat kann man



Figur 5.

Sedimentationsdiagramme der drei Hauptfraktionen in die die Proteine des Auszuges durch Fällung mit Ammoniumsulfat aufgeteilt werden können.
a) β-reiche Fraktion, erhalten bei der Auflösung der bei 1,5/10-Sättigung des Extrakts gewonnenen Ausfällung.
b) Uneinheitliche Fraktion, erhalten durch fortgesetzte Fällung bis 4/10 nach Entfernung der vorhergehenden Fraktion.
c) Fraktion, den Hauptteil der γ-Komponente enthaltend. Erhalten bei Auflösung des zwischen 4/10 und 7/10 fallenden Materials.
Die α-Komponente ist in sämtlichen Fraktionen vorhanden.

in einem Gerstenauszug vorkommende Stickstoffverbindungen bis zu einem gewissen Grad trennen. Die Erfahrung zeigte, dass man sie am besten durch stufenweisen Ammoniumsulfatzusatz bis zu 1,5/10-, 4/10- und 7/10-Sättigung zuerst in drei Hauptfraktionen aufteilte. Nach jedem Salzzusatz zentrifugierte man die Fällung ab, wusch und löste sie in Standardpuffer auf. Figur 5 zeigt Sedimentationsdiagramme dieser Hauptfraktionen. Diese sollen im folgenden jede für sich behandelt werden.

1,5/10-Fraktion.

Das Sedimentationsdiagramm dieser Fraktion hat zwei Maxima, das grössere β, das kleinere α entsprechend. (Siehe Fig. 5 a.) Die Komponenten sind jedoch mit uneinheitlichem Material verunreinigt. Das Sedimentationsbild stimmte mit dem in Figur 3, b und c, wiedergegebenen fast überein. Die Lösung, der dieses Diagramm entsprach, war durch fraktionierte Dialyse erhalten worden.

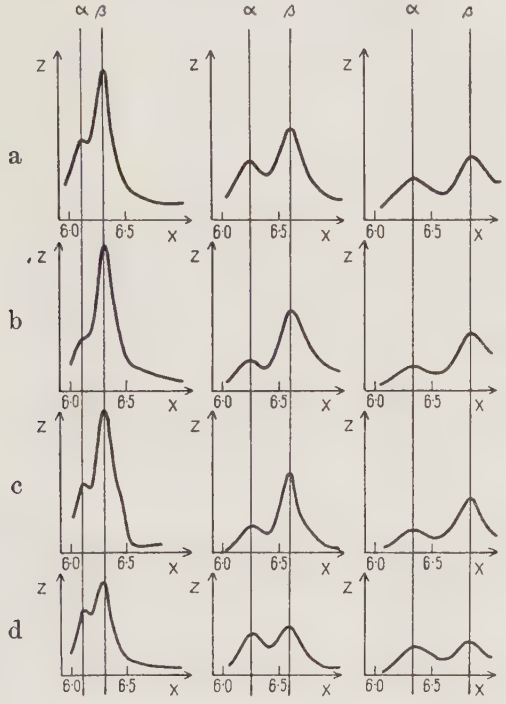
Die durch Fällung bei niederem Sättigungsgrad erhaltenen Fraktionen konnten nie vollständig wieder in Lösung gebracht werden in einer Salzlösung, und die Lösungen opaleszierten immer mehr oder weniger. Filtrieren durch Papierbrei, was sich in andern Fällen als besonders effektiv erwiesen hatte, war nicht hinreichend, um vollständig klare Lösungen zu erhalten. Das Gleiche gilt für das Zentrifugieren in einer gewöhnlichen Laboratoriumszentrifuge. Bei der Ultrazentrifugierung wurden die Lösungen jedoch klar. Sie waren sehr schwach gefärbt. Die bei längerer Dialyse oder Kohlensäurefällung erhaltenen β-reichen Fraktionen gaben dagegen ohne Schwierigkeit vollkommen klare, aber dunkelbraune Lösungen.

In der 1,5/10-Fraktion konnte β durch Umfällung bei geringeren Salzgehalten angereichert werden. Beispiele dafür gibt Figur 6. Eine Umfällung bei 0,75/10 liefert eine β-reichere Lösung (Fig. 6 b), während die zwischen 0,75/10 und 1,5/10 erhaltene Fraktion mehr niedermolekulares Material enthält (Fig. 6 d). Bei einer Umfällung bei noch niedrigerem Salzgehalt, zum Beispiel 0,5/10, wie in Figur 6 c, erhält man bloss eine unbedeutende Erhöhung der relativen Konzentration von β. (Vgl. Fig. 6, b und c.) Diese Umfällung ist jedoch mit grossem Materialverlust verbunden. Es ist unzweckmässig, den Auszug zu Beginn nur bis zu 0,75/10 zu fällen, da diese Fällung feinverteilt und schwer abzentrifugierbar ist.

Gleich wie bei den andern in diesem Kapitel genannten Versuchen führte man die Fällungen bei Raumtemperatur aus.

Wenn man eine Lösung mit Ammoniumsulfat bis zu 0,5/10-, 0,75/10- und 1,5/10-Sättigung versetzt, so wird sie 0,3-, 0,4- und 0,8-m an diesem Salz. Bei der Ausfällung aus Standardpuffer werden die betreffenden Ionenstärken ca. 1,1, 1,5 und 2,7.

Bei einer Anzahl orientierender Versuche wurde auch die Ausfällung der β-Komponente durch Zusatz kleiner Mengen Natrium- oder Kaliumsulfat studiert. Die β-reichen Fraktionen, die man



Figur 6.

Sedimentationsdiagramme von Versuchen, die β-Komponente zu reinigen.
a) Ausgangslösung, erhalten bei der Auflösung des bei 1,5/10-Sättigung mit Ammoniumsulfat aus dem Auszug ausgefällten Materials.
b) Auflösung der aus obiger Fraktion bei 0,75/10-Sättigung erhaltenen Fällung.
c) Auflösung der aus obiger Fraktion bei 0,50/10-Sättigung erhaltenen Fällung.
d) Auflösung der Fällung entstanden bei 1,5/10-Sättigung der Fraktion a) nachdem das bei 0,75/10 Gefällte entfernt war.

als Ausgangslösungen für diese Versuche verwendete, waren in Standardpuffer gelöst. Wie sich zeigte, erhielt man eine beträchtliche Ausfällung von β in Lösungen, die 0,2- bis 0,5-m an Natrium- resp. Kaliumsulfat waren. Dieser Umstand verdient Beachtung. 5-%ige (ca. 0,3-m) Kaliumsulfatlösungen wurden oft, u. a. von Bishop, als Extraktionsmittel für Gerstenproteine verwendet.

4/10-Fraktion.

Diese Fraktion ist so uneinheitlich, dass man keinen einzigen definierten Gipfel direkt im Sedimentationsdiagramm wahrnehmen kann. (Siehe Fig. 5 b.) Bei der Fraktionierung nach dem auf S. 22 beschriebenen Dialysenverfahren zeigte sich jedoch, dass die erwähnte Fraktion, ausser einer überwiegenden Menge uneinheitlichen Materials auch gewisse Mengen α, β und γ enthalten dürfte. Inwieweit auch δ vorkam entzog sich jeder Beurteilung.

Fällt man einen Extrakt direkt durch 4/10-Sättigung, so enthält das Ausgefallene natürlich bedeutend mehr β, als wenn man einen grossen Teil dieser Komponente zuerst durch Ammoniumsulfat bei geringerem Sättigungsgrad abtrennt. Es ist jedoch nicht einmal in diesem Fall möglich, eine definierte Komponente im Sedimentationsdiagramm direkt wahrzunehmen, sondern die Gradientenkurven haben im grossen und ganzen dasselbe Aussehen wie in Figur 5 b.

Die zwischen den Grenzen 1,5/10- und 4/10-Sättigung ausfallende Fraktion ist sehr leicht löslich. Trennt man die Fällung in einer gewöhnlichen Laboratoriumszentrifuge ab, so erhält man eine vollkommen klare Lösung z. B. beim Zusatz von destillertem Wasser. Die der feuchten Fällung anhaftenden Salze sind hinreichend für die Auflösung der Globuline.

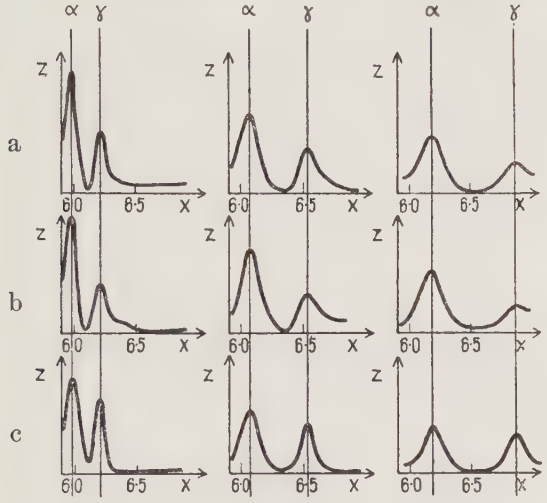
7/10-Fraktion.

Die beim weiteren Ammoniumsulfatzusatz bis zu 7/10-Sättigung ausfallende Fraktion ist ebenfalls uneinheitlich. Ihre Menge ist etwas geringer als die der vorhergenannten Intervalle. Ausser der uneinheitlichen Hauptkomponente sieht man ein durch die γ-Komponente bedingtes Maximum. (Siehe Fig. 5 c.) Fällt man direkt durch 7/10-Sättigung, so erhält man eine noch uneinheitlichere Fraktion, deren Sedimentationsdiagramme am ehesten mit Figur 5 b übereinstimmen. Eine Ausbuchtung auf der rechten Seite der Gradientkurve, die mit dem Vorkommen der γ-Komponente hätte in Beziehung gesetzt werden können, war jedoch wahrzunehmen.

Auch die zwischen 4/10- und 7/10-Sättigung ausgefällte Frak-

tion ist sehr leichtlöslich. In Standardpuffer löst sie sich praktisch vollständig.

Dialysiert man diese Fraktion gegen destilliertes Wasser bis die spezifische Leitfähigkeit bis auf etwa $3 \cdot 10^{-4}$ $Ohm^{-1} \cdot cm^{-1}$ gesunken ist, so werden praktisch alle Globuline ausgefällt. Die Fällung kann in Standardpuffer oder andern Salzlösungen nicht



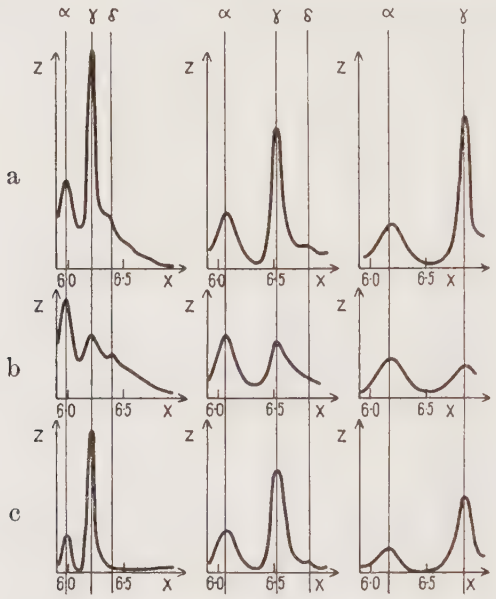
Figur 7.

Sedimentationsdiagramme, erhalten bei Versuchen, die α- und γ-Komponente durch fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat zu trennen.
a) Ausgangslösung.
b) Auflösung der Fällung, entstanden bei Sättigung der obigen Lösung bis zu 5/10.
c) Auflösung der Fällung, entstanden bei 6/10-Sättigung der Ausgangslösung, nachdem die bei 5/10 ausgefallene Fraktion entfernt war.

vollständig gelöst werden, aber der Rückstand ist verhältnismässig unbedeutend. Die Lösung enthält hauptsächlich α und γ in ungefähr gleich grossen Mengen. (Siehe Fig. 9 a.) Weiter findet man uneinheitliches Material, mit sowohl geringerem Molekulargewicht als α als auch grösserem als γ, aber in geringer Konzentration. Diese Lösung ist dunkelbraun.

Das auf diese Weise durch Ammoniumsulfatfraktionierung und Dialyse gegen destilliertes Wasser gewonnene Material verwendete man zur Herstellung möglichst α- resp. γ-reicher Lösungen. Hierbei kombinierte man mehrere Methoden. In erster Linie teilte man die Lösungen mit Hilfe von Beams luftturbinengetrie-

bener Zentrifuge in Fraktionen auf, die die Komponenten entsprechend ihrer Schwere angereichert enthielten. (Siehe S. 38.) In gewissen, bei diesen Zentrifugierungen erhaltenen Fraktionen bekommt man eine Erhöhung der relativen Konzentration der



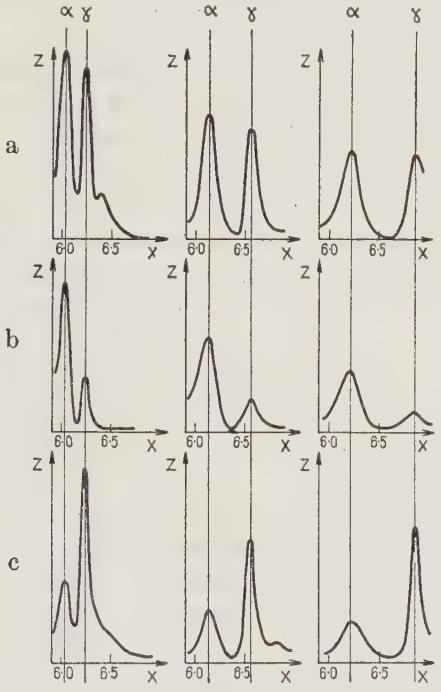
Figur 8.

Sedimentationsdiagramme von Versuchen, die γ-Komponente von der δ-Komponente und hochmolekularen Verunreinigungen zu befreien.
a) Ausgangslösung.
b) Auflösung der bis zu 5,5/10-Ammoniumsulfatsättigung erhaltenen Fällung.
c) Auflösung der bei 7/10-Sättigung der Ausgangslösung erhaltenen Fällung, nachdem die bei 5,5/10 fallende Fraktion entfernt war.

α- resp. γ-Komponente, aber gleichzeitig auch einen Konzentrationanstieg der nieder- resp. hochmolekularen Verunreinigungen. Eine grosse Zahl von Versuchsserien wurde durchgeführt, um die Möglichkeit zu studieren, durch fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat teils diese Verunreinigungen zu entfernen, teils α und γ weiter zu fraktionieren. Die hierbei erhaltenen Resultate können folgendermassen zusammengefasst werden:

Bei Sättigung bis etwa 5/10 fällt eine Fraktion aus, in der das Verhältnis von α zu γ grösser ist als in der Ausgangslösung. Zwischen ca. 5/10- und 7/10-Sättigung wird dagegen γ ange-

reichert. Die Fällungsintervalle der beiden Komponenten überdecken doch einander teilweise, aber allem nach fällt γ in einem engeren Sättigungsintervall als α. Der Schwerpunkt für dieses Intervall dürfte für α bei ungefähr 5/10- und für γ bei 6/10-



Figur 9.

Fraktionierung einer α—γ-Lösung in der Luftturbinenzentrifuge.
a) Ausgangslösung.
b) α-reiche Endfraktion (IV im Schema S. 41).
c) γ-reiche Endfraktion (I im Schema S. 41).

Sättigung liegen. Die hochmolekularen Verunreinigungen werden praktisch vollständig vor 5,5/10-Sättigung gefällt, was bei der präparativen Arbeit von Bedeutung war. Hier nimmt auch die Menge von δ in der teilweise gefällten Lösung bedeutend ab. Die braune Farbe schien hauptsächlich den hochmolekularen Verunreinigungen zu folgen. Die niedermolekularen Verunreinigungen fielen etwas vor α, aber der Unterschied war so gering, dass es schwer war, sie auf diese Art aus α-reichen Lösungen zu entfernen.

Ein paar Beispiele von diesen Versuchsserien sind in den Figuren 7 und 8 wiedergegeben.

Figur 7 a entspricht einer relativ α-reichen Lösung. Sie wurde nacheinander bei 5/10- und 6/10-Sättigung gefällt. Die Zusammensetzung der aufgelösten Fällungen geht aus den Figuren 7 b resp. 7 c hervor. Die Diagramme lassen eine deutliche Verschiebung im Mengenverhältnis von α und γ erkennen.

Figur 8 a entspricht einer γ-reichen Ausgangslösung, die ausserdem eine beträchtliche Menge hochmolekularer Verunreinigungen enthält. Figur 8 b zeigt, was aus dieser Lösung bei 5,5/10-Sättigung, und 8 c, was bei weiterer Sättigung zu 7/10 ausfiel. Aus den Figuren geht hervor, dass die relative Konzentration von α, δ und den hochmolekularen Verunreinigungen beträchtlich erhöht ist in der ersten Fraktion. Die zweite enthält eine bedeutend reinere γ-Lösung.

Die Fraktion endlich, die zwischen 8/10 und vollständiger Sättigung ausfällt, ist sehr klein, und es zeigte sich, dass sie aus einer uneinheitlichen Mischung von hauptsächlich relativ niedermolekularen Stoffen besteht.

Einige Fraktionierversuche wurden bei verschiedenen pH-Werten ausgeführt; so fällte man beispielsweise eine Lösung, die ungefähr gleiche Teile α und γ enthielt zuerst bei 5/10-Sättigung und dann bei 7/10-Sättigung, das eine Mal bei pH ca. 6, das andere Mal bei pH ca. 8. Die erhaltenen Fraktionen waren für die zwei Fällungsarten in beiden Fällen identisch.

Fraktionierung durch Zentrifugierung.

Als ein Glied der präparativen Arbeit, die α- und γ-Komponente voneinander zu trennen, ging die Fraktionierung mit Beams durch eine Luftturbine getriebenen Zentrifuge ein (*2*). Der zur Verfügung stehende Typ hatte eine maximale Umdrehungszahl von 23 000 Umdrehungen per Minute und die durchschnittliche Zentrifugalkraft betrug ungefähr $35\,000 \times g$. Der Rotor hatte Platz für 16 Zentrifugierröhrchen, jedes mit einem Fassungsvermögen von 6 ml. Da die schwereren Moleküle mit grösserer Geschwindigkeit sedimentieren als die leichteren, reichern sie sich im unteren Teil der Zentrifugenröhrchen an. Dadurch dass man nach Schluss der Zentrifugierung verschiedene Schichten der

Lösung abpipettiert, kann man Fraktionen erhalten, in denen die Molekülarten in anderen Verhältnissen enthalten sind als in der ursprünglichen Lösung. Der Trennungsgrad beruht auf den Sedimentations- und Diffusionsgeschwindigkeiten der verschiedenen Molekülarten, auf Umdrehungszahl und Dauer der Zentrifugierung und der Art, wie man die Aufteilung in Fraktionen vornimmt. Durch wiederholte Zentrifugierung kann man zu einem höheren Trennungsgrad kommen.

Die Voraussetzungen, um die Gerstenglobuline auf diese Weise fraktionieren zu können, sind wegen ihrer langsamen Sedimentation und raschen Diffusion nicht so günstig. Es war doch möglich, eine so gute Separation der α- und γ-Komponenten zu erhalten, dass die Methode eine praktische Bedeutung für die präparative Arbeit erhielt.

Um Fraktionierungszeit und Aufteilungsart für die Fraktionen zu erproben, führte man eine Anzahl orientierender Versuche aus, wobei die erhaltenen Fraktionen in der Svedberg'schen Ultrazentrifuge analysiert wurden. Aufteilung der Lösungen in zwei gleichgrosse Volumina nach sechs Stunden Zentrifugierzeit bei 23 000 Umdrehungen per Minute erwies sich als günstig. Mindestens drei aufeinanderfolgende Zentrifugierungen waren notwendig. Nach der zweiten und dritten Zentrifugierung vereinigte man gewisse Fraktionen, wie es im Schema auf Seite 41 angeben ist, so dass man nur vier Fraktionen erhielt.

Fraktion I ist die γ-reichste. Durchschnittlich war das Verhältnis der γ- und α-Komponente 1,6 mal so gross als in der Ausgangslösung. Nach zwei weiteren Zentrifugierungen wurde dieses Verhältnis 2,5—3 mal so gross. Die absolute γ-Konzentration in der Bodenfraktion wird bei jeder Zentrifugierung grösser. Nach der Dritten war sie 3—4 mal grösser als in der Ausgangslösung.

In Fraktion IV hat die α-Komponente die grösste Relativkonzentration. Das Verhältnis der Mengen der α- und γ-Komponente variierte von Fall zu Fall ziemlich stark. Gewöhnlich war es 3—5 mal so gross als in der Ausgangslösung, konnte aber in einzelnen Fällen bis zum zehnfachen steigen. Die absolute α-Konzentration war bedeutend niedriger als die der Ausgangslösung.

Fraktion II hatte eine mit der Ausgangslösung sehr nahe

übereinstimmende Zusammensetzung und in Fraktion III betrug die relative α-Konzentration ungefähr das Doppelte von der in der Ausgangslösung.

In den α-reichen Lösungen reichert sich auch der niedermolekulare Anteil der Verunreinigungen der Ausgangslösung an. Eine Verminderung der Menge dieser Verunreinigungen konnte jedoch durch Ultrafiltrierung erreicht werden. Als Filter verwendete man Alundumröhren, die mit einer Lösung von Nitrozellulose in Eisessig imprägniert waren. Es war jedoch ziemlich schwer, das Filter so herzustellen, dass die α-Komponente zurückblieb, die Verunreinigungen aber durchgelassen wurden.

Die höhermolekularen Verunreinigungen, die sich in den γ-reichen Bodenfraktionen anreicherten, können zu einem grossen Teil durch 5,5/10-Ammoniumsulfatsättigung ausgefällt werden. Ein Beispiel einer derartigen Reinigung wurde schon früher erwähnt. (Siehe S. (37) und Fig. 8.)

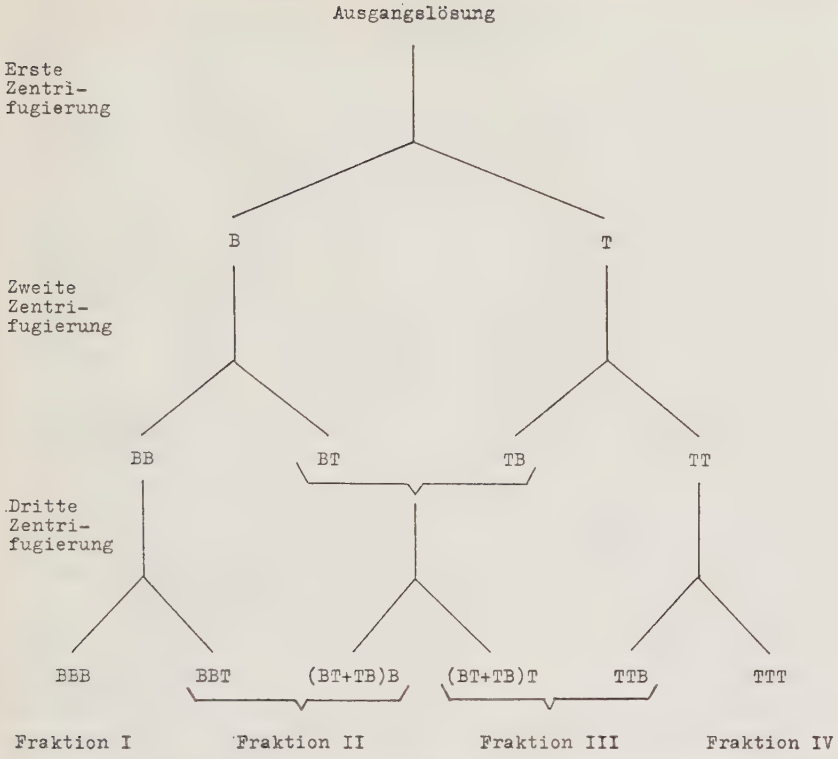
Die Sedimentationsdiagramme in Figur 9 können als ein typisches Beispiel dienen für den Grad der Trennung, den man nach drei Zentrifugierungen erhält.

Präparationsschema.

Im Vorhergehenden wurden mehrere Präparationsmethoden ausführlicher besprochen. Im folgenden sind diese Untersuchungen in einem Präparationsschema zusammengefasst, das sich als vorteilhaft erwies und für die späteren Präparationen angewendet wurde. Die Ziffern im Schema beziehen sich auf die folgende Beschreibung.

1) Als Ausgangsmaterial verwendete man zweizeilige schwedische Malzgerste (Kenia), geliefert durch A. B. Stockholms Bryggerier. Die Gerste wurde feingemahlen und gesiebt. Unterschiede in der Zusammensetzung der Proteinfraktionen wurden nicht beobachtet, die mit der Art des Mahlens oder Siebens hätten in Beziehung gesetzt werden können. Auch aus Gerste von verschiedenen Jahrgängen erhielt man alle vier Globulinkomponenten.

2) Als Extraktionsmittel verwendete man eine Salzlösung, die 1-m an NaCl, 0,06-m an Na_2HPO_4 und 0,04-m an NaH_2PO_4 und deren pH 7,0 war. 800 g feingemahlenes Mehl verrührte man

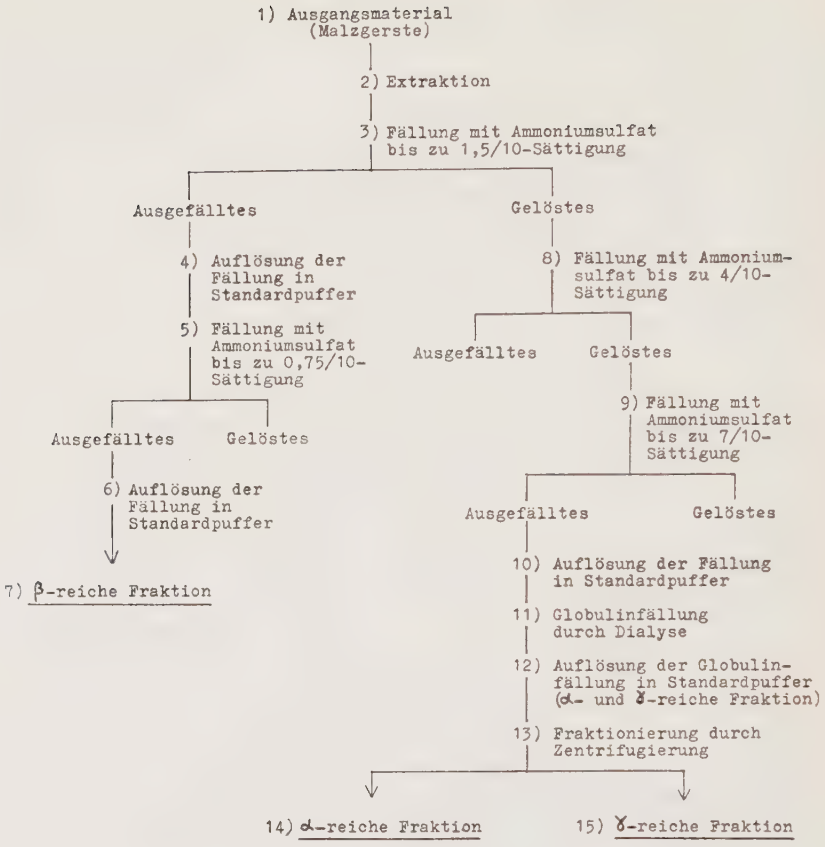


Schema über die Fraktionierung mit der Luftturbinen-Zentrifuge.

Mit B bezeichnet man die Fraktion, die man aus dem untern Teil der Zentrifugierröhrchen entnahm, mit T die überstehende Lösung, u. s. w.

mit 3 200 ml Extraktionsmittel, und die Extraktion, während der man langsam rührte, dauerte ungefähr 16 Stunden. Bei früheren Präparationen hatte man die Extraktion im Kühlraum (0° — + 4° C) ausgeführt. Da es sich später zeigte, dass speziell die Löslichkeit der γ-Komponente bei tieferer Temperatur stark abnimmt, extrahierte man bei Raumtemperatur. Nachteilige Folgen dieser Temperaturerhöhung konnten nicht festgestellt werden.

Nach der Extraktion trennte man das Mehl durch Zentrifugieren ab, worauf man den Auszug durch Papierbrei filtrierte. (Siehe S. 18.) Man erhielt ungefähr 2 400 ml Auszug, d. h. ungefähr 3/4 des Volumens des zugesetzten Extraktionsmittels. Der Auszug enthielt etwa 15 g Stickstoffverbindungen, entsprechend 2,5 g extrahierte Stickstoffverbindungen per 100 g Gerstenmehl.



Präparationsschema.

Dieses enthielt rund 10 g Stickstoffverbindungen per 100 g. Den Stickstoffgehalt bestimmte man durch Mikro-Kjeldahl, und bei der Berechnung des Gehaltes an Stickstoffverbindungen nahm man an, sie enthielten im Durchschnitt 17 % Stickstoff.[1]

Die Auszüge sind sehr uneinheitlich. (Vgl. S. 20 und die Sedimentationsdiagramme in Fig. 1 a.)

3) Der Auszug wurde mit Ammoniumsulfatzusatz bis zu 1,5/10-Sättigung gefällt. Entweder setzte man 11,5 g festes Ammoniumsulfat per 100 ml Auszug in kleinen Portionen unter gutem

[1] Man bestimmte den Stickstoffgehalt in sowohl α- als auch γ-reichen Fraktionen. In beiden Fällen erhielt man 17 %.

Umrühren zu oder auch 25 ml 4-m (gesättigte) Ammoniumsulfatlösung per 100 ml Auszug.

4) Nach Abzentrifugieren und Waschen der Fällung mit Ammoniumsulfatlösung (20 Teile gesättigte Lösung + 80 Teile Wasser), löste man sie in 200 ml Standardpuffer. Ein kleiner Rest verblieb jedoch ungelöst, und die Lösung opaleszierte immer mehr oder weniger. (Vgl. S. 32.) Man erhielt ungefähr 1,5 g Stickstoffverbindungen.

Die Fraktion enthält hauptsächlich die α- und β-Komponenten, die letztere jedoch in überwiegender Menge. (Vgl. die Sedimentationsdiagramme in Fig. 5 a.)

5) Die Lösung wurde durch 0,75/10-Sättigung mit Ammoniumsulfat gefällt durch Zusatz von 5,7 g festem Salz oder 11 ml 4-m (gesättigte) Ammoniumsulfatlösung per 100 ml.

6) Nach Abzentrifugieren und Waschen mit Ammoniumsulfatlösung (10 Teile gesättige Lösung + 90 Teile Wasser), löste man sie in 100 ml Standardpuffer. Sie löste sich, ohne einen nennenswerten Rückstand zu hinterlassen. Die Lösung opaleszierte doch auch in diesem Fall. Sie wurde jedoch bei Zentrifugierung in Beams präparativer Zentrifuge klarer. Eine Analyse des hierbei erhaltenen Sediments ergab, dass die die Opaleszenz verursachende Substanz rund 15 % Stickstoff enthielt. Die Lösung dialysierte man schliesslich gegen Standardpuffer.

7) Der Grad der Anreicherung der β-Komponente, die man durch obige Operationen erhält, wird durch die Figur 6 illustriert. Betreffend weiterer Umfällungen sei auf Seite 32 verwiesen. Es sei erwähnt, dass Möglichkeiten vorhanden sind, die gewonnene β-reiche Lösung weiter zu reinigen, indem man sie zuerst gegen destilliertes Wasser dialysiert, bis die spezifische Leitfähigkeit auf ungefähr 10^{-3} $Ohm^{-1} \cdot cm^{-1}$ gesunken ist, und dann mit Kohlensäure fällt. (Vgl. S. 27.)

8) Durch Zusatz von 18 g festem Ammoniumsulfat per 100 ml sättigte man die Lösung bis zu 4/10. Die Fällung wurde dann abzentrifugiert und verworfen. Sie enthielt ungefähr 2,5 g Stickstoffverbindungen und bestand zum grössten Teil aus uneinheitlichem Material. (Vgl. S. 34 und Fig. 5 b.) Bezweckt die Präparation nicht ein Aufarbeiten der β-Komponente, so kann man den ursprünglichen Auszug direkt bis zu 4/10 sättigen. (Durch Zusatz von 30 g festem Ammoniumsulfat per 100 ml Lösung.)

9) Die Lösung sättigte man bis zu 7/10 durch 20 g festes Ammoniumsulfat per 100 ml Lösung.

10) Die Fällung wurde abzentrifugiert und in 130 ml Standardpuffer gelöst. Sie löst sich leicht und vollständig. Man erhält ungefähr 2,0 g Stickstoffverbindungen.

Sedimentationsdiagramme von einer Ultrazentrifugierung einer solchen Lösung sind in Figur 5 c wiedergegeben.

11) Die Lösung dialysierte man gegen langsam fliessendes destilliertes Wasser in einem Cellophansack bei ungefähr + 4° C. Die Dialyse wurde abgebrochen, wenn die spezifische Leitfähigkeit auf ungefähr $3 \cdot 10^{-4}$ $Ohm^{-1} \cdot cm^{-1}$ gesunken war. (Vgl. S. 35.)

12) Nachdem die bei der Dialyse ausgefällte Globulinfraktion durch Zentrifugierung abgetrennt und mit destilliertem Wasser gewaschen war, löste man sie in 50 ml Standardpuffer auf. Man erhielt ungefähr 1 g Stickstoffverbindungen, hauptsächlich α- und γ-Komponente. (Vgl. S. 35 und Fig. 9 a.)

13) Die Lösung fraktionierte man durch Zentrifugierung in der Luftturbinen-Zentrifuge. (Siehe S. 39.) Eine Fraktionierung durch Elektrophorese ist auch möglich, obwohl bedeutend mühsamer. (Siehe S. 65.) Eine gewisse Fraktionierung erhält man auch durch Verminderung von Salzgehalt oder pH durch Dialyse. Hierbei fällt in erster Linie die γ-Komponente aus. (Vgl. S. 28.)

14) und 15) Die nach drei sukzessiven Zentrifugierungen erhaltenen α- resp. γ-reichen Fraktionen hatten eine Zusammensetzung, der die Sedimentationsdiagramme der Figur 9, b und c entsprechen. Die α-reichste Fraktion, 6 ml, enthielt 0,05—0,10 g Stickstoffverbindungen; die γ-reichste, ebenfalls 6 ml, ungefähr 0,2 g. Um das Fassungsvermögen der Luftturbinenzentrifuge voll auszunützen (gegen 100 ml Lösung), nahm man die Zentrifugierungen in der Regel mit Material von zwei Extraktionen vor. Durch eine Anzahl weiterer Zentrifugierungen kann die Fraktionierung weiter getrieben werden.

Die Menge der niedermolekularen Verunreinigungen, die sich in der α-reichsten Fraktion ansammeln, kann durch Ultrafiltrierung vermindert werden (vgl. S. 40), und die hochmolekularen Verunreinigungen, die sich in der γ-reichsten Fraktion ansammeln, können durch 5,5/10-Ammoniumsulfatsättigung ausgefällt werden. (Vgl. S. 37 und Fig. 8.) Hierbei fällt auch der Hauptteil von δ.

Sowohl den Auszug wie die daraus hergestellten Fraktionen versetzte man mit Toluol. Die verschiedenen Fraktionen konnten so monatelang im Kühlraum bei ungefähr + 4° C aufbewahrt werden, ohne dass irgendwelche wesentliche Veränderungen bei der Untersuchung mit der Ultrazentrifuge hätten festgestellt werden können. Eine unbedeutende Menge Sediment setzte sich doch nach und nach in den Gefässen ab.

KAP. II.

Sedimentationskonstanten der Gerstenglobuline.

Bei den Ultrazentrifugierungen, die der Berechnung der unten angegebenen Werte für die Sedimentationskonstanten der Gerstenglobuline zugrunde liegen, verfolgte man die Sedimentation mit Hilfe der Skalenmethode. Die Sedimentationskonstante berechnete man nach Gleichung (1) Seite 16. Für eine detailliertere Beschreibung, wie man eine solche Berechnung durchführt, und für die experimentelle Technik der Ultrazentrifugierung sei auf die vorher genannte Monographie von Svedberg und Pedersen verwiesen (*39*, *a*, *b*).

Folgende experimentelle Bedingungen herrschten bei den ausgeführten Zentrifugierungen: Umdrehungszahl: 68 000—69 000 Umdrehungen per Minute, Zentrifugalkraft ca. 340 000 × g. Lichtquelle: Quecksilberlampe; Lichtfilter: Wratten 77 ($\lambda = 546$ mμ). Negativmaterial: Eastman Spectroscopic Plates, Type IV—G (für stark gefärbte Lösungen die minder kontrastreichen Agfa Isochrom-Platten). Zentrifugierungszeit: ca. 1 Stunde (bei Zentrifugierungen der α-Komponente manchmal 2 Stunden). Exponierungsintervall: gewöhnlich 10 Minuten. Die Temperatur konnte während der Zentrifugierung ein paar Grade steigen. In der Regel lag die Mitteltemperatur bei einem Versuch zwischen 24° und 27° C.

Die Ultrazentrifugierungen gaben folgende Mittelwerte für die Sedimentationskonstanten der α-, β-, γ- und δ-Komponenten (in Einheiten 10^{-13} c. g. s.):

$$s_\alpha = 2{,}49$$

$$s_\beta = 6{,}21$$

$$s_\gamma = 8{,}30 \quad \left\{ \begin{array}{l} \text{(Dieser Wert gilt für sehr verdünnte} \\ \text{Lösungen, bei grösserer Konzentration} \\ \text{nimmt } s_\gamma \text{ merkbar ab)} \end{array} \right.$$

$$s_\delta = 12{,}0$$

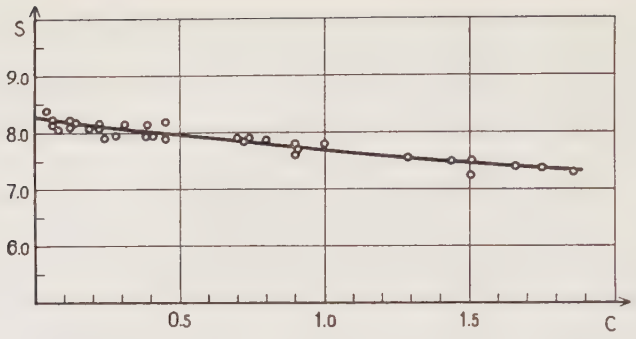
Im Hinblick auf die Versuche, die den Bestimmungen zugrunde lagen, kann Folgendes erwähnt werden:

Die Sedimentationskonstante der α-Komponente wurde bei ungefähr 400 Zentrifugierungen bestimmt, die zum grössten Teil zum Studium der verschiedenen Trennungsverfahren ausgeführt wurden. Der oben genannte Mittelwert ist aus den letzten zuverlässigsten 100 Bestimmungen gebildet. Von diesen wichen die Hälfte um weniger als $\pm$ 2,5 % vom Mittelwert ab. Die Konzentration der α-Komponente variierte von einigen Zehntelprozent bis hinauf zu 2 Prozent, in den meisten Fällen lag sie zwischen 0,5 % und 1 %. Die Lösungen enthielten ausserdem die γ-Komponente, deren Konzentration in der Regel geringer als die der α-Komponente war. Die Sedimentationskonstante zeigte keinen merkbaren Gang mit der Konzentration. (Vgl. Tab. 4 S. 57.)

Die Sedimentationskonstante der β-Komponente bestimmte man bei ungefähr 100 Zentrifugierungen, und der Mittelwert ist aus 50 der zuverlässigsten letzten Bestimmungen gebildet. Die Hälfte wich um weniger als $\pm$ 3 % vom Mittelwert ab. Die Konzentration der β-Komponente variierte von einigen Zehntelprozent bis zu ungefähr 1,5 Prozent. Die zentrifugierten Lösungen enthielten ausserdem die α-Komponente, deren Konzentration in der Regel $^1/_3$ bis $^1/_2$ von der der β-Komponente betrug. Auch in diesem Fall zeigte die Sedimentationskonstante keinen merkbaren Gang mit der Konzentration.

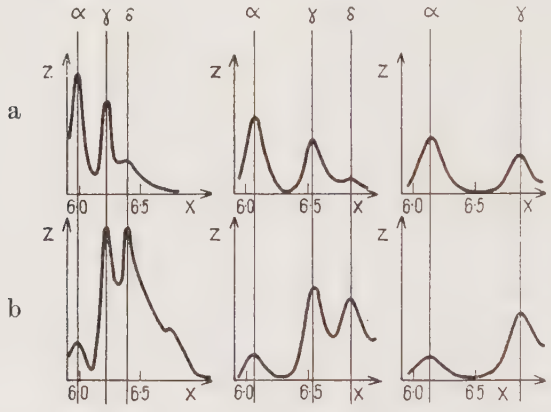
Die Sedimentationskonstante der γ-Komponente bestimmte man bei ungefähr 400 Zentrifugierungen. Die Konzentration variierte von ca. 0,05 bis nahezu 2 %. Ausser γ enthielten die Lösungen wechselnde Mengen von α und δ. Es zeigte sich, dass die Sedimentationskonstante mit der Konzentration merkbar abnahm. Eine derartige Konzentrationsabhängigkeit der Sedimentationskonstante wurde früher bei anderen Proteinen festgestellt.

Um den Gang der Sedimentationskonstante mit der Konzentration zu untersuchen, griff man auf Resultate der grossen Zahl von Ultrazentrifugierungen von γ-Lösungen verschiedener Konzentration zurück. Die dabei erhaltenen Werte sind in Figur 10 graphisch zusammengestellt. (Siehe auch Tab. 4, S. 57.) Die Lösungen enthielten ausser γ auch α, aber sie wurden natürlich



Figur 10.

Die Sedimentationskonstante der γ-Komponente als Funktion der Konzentration. C ist in Prozent ausgedrückt.



Figur 11.

Sedimentationsdiagramme von Lösungen bei der Herstellung einer δ-reichen Fraktion.

a) Ausgangslösung (Lösungsmittel: Standardpuffer).

b) Auflösung der bei der Dialyse obiger Lösung gegen 0,2-m NaCl erhaltenen Fällung.

so gewählt, dass die relative Konzentration der α-Komponente klein war. Das Konzentrationsverhältnis der Komponenten blieb nahezu unverändert in den in der Figur wiedergegebenen Versuchen. Die Konzentration der α-Komponente war ungefähr halb so gross, wie die der γ-Komponente. Man könnte denken, der beobachtete Gang in der Sedimentationskonstante der γ-Komponente beruhe auf der Viskositätserhöhung der Lösung, verursacht durch die α-Komponente, deren Konzentration ja bei wachsender γ-Konzentration ebenfalls zunahm. Die Viskositäts-

korrektion berücksichtigte nämlich nur das Lösungsmittel. Aber in andern Versuchen, so gewählt, dass die Konzentration von γ ungefähr konstant blieb, während die von α variierte, konnte kein Gang bemerkt werden. Um in erster Linie diesen Effekt zu untersuchen, bestimmte man die Viskosität α-reicher Lösungen. Dabei stellte man fest, dass eine 0,5 %-ige α-Lösung nur eine ungefähr 2 % höhere Viskosität hat als das Lösungsmittel, während die Sedimentationskonstante für γ in einer Lösung mit 0,5 % α und 1 % γ ungefähr 7 % niedriger ist, als in einer sehr verdünnten Lösung. Aus diesen Versuchen geht hervor, dass der beobachtete Gang im wesentlichen auf der Abhängigkeit der Sedimentationskonstante von der γ-Konzentration beruhen dürfte.

Die Sedimentation der δ-Komponente konnte in ungefähr 80 Zentrifugierungen verfolgt werden. Wegen ihrer absolut und relativ geringen Konzentration konnte die Sedimentationskonstante nicht so genau ermittelt werden. Man erhielt doch einen approximativen, zwischen 11 und 13 liegenden Wert.

Einige genauere Bestimmungen wurden jedoch ausgeführt. Hierbei verwendete man δ-reiche Lösungen, die beim Auflösen der geringen Fällung erhalten wurden, welche bei der Dialyse von Lösungen mit grösseren Mengen α und γ und etwas δ in Standardpuffer gegen eine 0,2-m NaCl-lösung entstand. In Figur 11 sind einige Sedimentationsdiagramme einer Zentrifugierung einer solchen δ-reichen Fraktion wiedergegeben und von der Lösung, aus der die Fraktion ausgefällt war. Bei der Ultrazentrifugierung von vier verschiedenen Lösungen erhielt man folgende Werte für die Sedimentationskonstante von δ: 12,48, 11,68, 12,12 und 11,88. Mittel: 12,0.

KAP. III.

Stabilität der Gerstenglobuline.

Die Proteine sind nur innerhalb gewisser pH-Gebiete stabil. In hinreichend sauren oder alkalischen Lösungen erfahren sie irreversible Veränderungen (werden denaturiert). Einige Proteine können auch reversibel dissoziiert werden bei pH-Verschiebung der Lösung, wobei wohldefinierte Submultipeln der ursprünglichen Moleküle gebildet werden (*38*, *7*). Auch Salze (*19*) und Aminoverbindungen (*26*, *34*) können Dissoziation bewirken. Ebenfalls bei Verdünnung kommt sie vor (*19*, *47*). Die Dissoziationsreaktionen hat Brohult eingehend am Hämocyanin von Helix pomatia studiert (*5*). Für eine eingehendere Behandlung der dahingehörenden Fragen sei auf Brohults Arbeit und eine Übersicht in Svedberg und Pedersens Monographie hingewiesen (*39*, *a*, *b*).

Über die Stabilität der Samenproteine liegen verhältnismässig wenig Angaben vor. Es kann doch erwähnt werden, dass Edestin, Amandin und Excelsin, die von Svedberg und Mitarbeitern (*41*, *40*) untersucht wurden, vom isoelektrischen Punkt (pH ca. 5,5) bis ungefähr pH 10 stabil waren. Bei höheren pH-Werten zerfallen sie. In Krejci und Svedbergs Arbeit über Weizenproteine (*13*) findet man weiter eine Versuchsserie, in der man einen beginnenden Zerfall im alkalischen Gebiet bei ungefähr pH 12,6 feststellen konnte. Die betreffenden Proteine waren aus einem KCl-auszug von Weizenmehl durch Dialyse gegen destilliertes Wasser erhalten worden. Ultrazentrifugierungen zufolge lagen zwischen pH 5,3 und 11,0 drei Komponenten vor, deren Sedimentationskonstanten ungefähr 3, 7 und 11 waren. Die letztgenannte Komponente polymerisierte in konzentrierten Lösungen, dissoziierte aber wieder bei Verdünnung. Krejci und Svedberg (*12*) untersuchten auch Pomelin aus Orangenkernen. Sie fanden, dass die Hauptkomponente (Sedimentationskonstante 11,38) im pH-Gebiet 3,5 bis 12 stabil war.

Zur Untersuchung der Stabilität der Gerstenglobuline führte man einige Versuchsserien durch. Diese hatten zum Zweck, die Proteine in dieser Hinsicht zu charakterisieren und gleichzeitig das Sammeln von Erfahrungen zu erlauben, wie sie ohne Risiko für Zerfall behandelt werden können. Die Untersuchungen betrafen hauptsächlich den pH-Einfluss und umfassten die α-, β- und γ-Komponente.

Es ist bekannt, dass die Tendenz eines Proteins zur Dissoziation auf der Vorgeschichte der Lösung beruhen kann. Deshalb mag es berechtigt sein kurz zu berichten, wie die Lösungen hergestellt wurden, die man bei den Untersuchungen über die Stabilitätsverhältnisse der Gerstenproteine verwendete.

Bei der Präparation einer α—γ-Lösung verwendete man die Proteinfraktion, die zwischen 4/10- und 7/10-Ammoniumsulfatsättigung aus einem Gerstenauszug ausfällt. Die Fällung löste man in Standardpuffer und dialysierte sie gegen destilliertes Wasser, bis die spezifische Leitfähigkeit auf ungefähr $3 \cdot 10^{-4}$ $Ohm^{-1} \cdot cm^{-1}$ gesunken war. Die entstandene Globulinfällung wurde ihrerseits in Standardpuffer gelöst. Zu den Versuchen verwendete man eine der Fraktionen, die man aus dieser Lösung beim Zentrifugieren mit Beams präparativer Zentrifuge erhielt.

Die β-Lösungen stellte man durch Sättigung eines Auszuges mit Ammoniumsulfat her, worauf die in Standardpuffer gelöste Fraktion durch 0,75/10-Sättigung umgefällt wurde. Die so gewonnene Fällung löste man in Standardpuffer und verwendete sie für die Versuche.

Bei sämtlichen Stabilitätsversuchen dialysierte man die Ausgangslösungen (Lösungsmittel: Standardpuffer) gegen Puffer verschiedenen pH's, worauf man die Lösungen in der Ultrazentrifuge analysierte. Die Pufferlösungen enthielten auch NaCl und waren wie der Standardpuffer 0,2-m an diesem Salz. Die totale Salzkonzentration war jedoch in einigen Fällen etwas höher als im Standardpuffer. (Vgl. Tab. 1—3.)

Die pH-Stabilität der α- und γ-Komponenten untersuchte man in Lösungen, die diese Komponenten zusammen enthielten. In der Tabelle 1 und Figur 12 sind die Resultate der in alkalischer Lösung ausgeführten Versuche wiedergegeben. Von pH 7,0 bis und mit pH 11,2 erhielt man Sedimentationsdiagramme, die sich nicht mehr voneinander unterschieden, als es bei der wieder-

Tabelle 1.

Stabilität der α- und γ-Komponenten in alkalischen Lösungen.

Puffer	pH	Konzentration $\alpha+\gamma$ in %	Relativkonzentration		s_α	s_γ
			α	γ		
NaCl 0,20-m Na_2HPO_4 0,030-m NaH_2PO_4 0,020-m	7,0	1,34	0,54	0,46	2,53	7,74
NaCl 0,20-m KH_2PO_4 0,045-m $Na_2B_4O_7$ 0,028-m	8,0	1,23	0,56	0,44	2,53	7,72
NaCl 0,20-m $Na_2B_4O_7$ 0,025-m Na_2CO_3 0,025-m	9,4	1,24	0,55	0,45	2,55	7,86
NaCl 0,20-m $Na_2B_4O_7$ 0,005-m Na_2CO_3 0,045-m	10,5	1,20	0,53	0,47	2,40	7,45
NaCl 0,20-m Na_2HPO_4 0,050-m NaOH 0,020-m	11,2	1,22	0,54	0,46	2,22	7,50
NaCl 0,20-m Na_2HPO_4 0,050-m NaOH 0,040-m	11,9	Partieller Zerfall			2,0	7,5
NaCl 0,20-m NaOH 0,050-m	12,6	Fortgesetzter Zerfall			—	—

Tabelle 2.

Stabilität der α- und γ-Komponenten in sauren Lösungen.

Puffer	pH	Konzentration $\alpha+\gamma$ in %	Relativkonzentration		s_α	s_γ
			α	γ		
NaCl 0,20-m Na_2HPO_4 0,030-m NaH_2PO_4 0,020-m	7,0	1,28	0,62	0,38	2,56	7,61
NaCl 0,20-m Na_2HPO_4 0,005-m NaH_2PO_4 0,045-m	5,9	1,24	0,63	0,37	2,50	7,70
NaCl 0,20-m NaAc 0,035-m HAc 0,015-m	5,0	1,12	0,69	0,31	2,52	7,91
NaCl 0,20-m NaAc 0,009-m HAc 0,041-m	4,0	0,54	$>0,95$	$<0,05$	2,39	—

holten Zentrifugierung ein und derselben Lösung der Fall zu sein pflegt. Die Sedimentationskonstanten und die relativen und absoluten Konzentrationen[1] der Komponenten zeigten auch eine entsprechende Übereinstimmung. Daraus dürfte man den

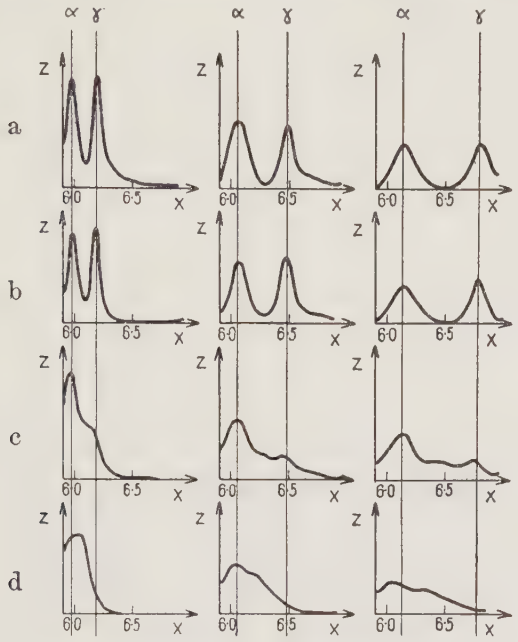


Fig. 12.

Sedimentationsdiagramme von Versuchen über die Stabilität der α- und β-Komponenten in alkalischen Lösungen.

a) pH 7,0. b) pH 11,2. c) pH 11,9. d) pH 12,6.

Schluss ziehen, dass die α- und γ-Komponenten in diesem pH-Gebiet stabil sind, wenigstens unter den in den Versuchsserien herrschenden Bedingungen.

Bei einem etwas höheren pH, 11,9, ist dagegen eine beträchtliche Veränderung eingetreten. Zwei Komponenten, nach der Sedimentationskonstanten hätten sie α und γ entsprechen können, konnten zwar immer noch im Sedimentationsdiagramm nachgewiesen werden. Die Menge der schnelleren Komponente ist jedoch bedeutend kleiner geworden. Was die Langsamere betrifft,

[1] Die Konzentration berechnete man durch graphische Integration in der bei der Ultrazentrifugierung gebräuchlichen Weise.

Tabelle 3.

Stabilität der β-Komponente in alkalischen Lösungen.

Puffer	pH	s_β	Anmerkung
NaCl 0,20-m Na_2HPO_4 0,030-m NaH_2PO_4 0,020-m	7,0	6,02	
NaCl 0,20-m KH_2PO_4 0,045-m $Na_2B_4O_7$ 0,028-m	8,0	5,44	Beginnender Zerfall.
NaCl 0,20-m KH_2PO_4 0,020-m $Na_2B_4O_7$ 0,040-m	8,9	—	Deutlicher Zerfall.
NaCl 0,20-m $Na_2B_4O_7$ 0,025-m Na_2CO_3 0,025-m	9,4	—	Fortgesetzter Zerfall.

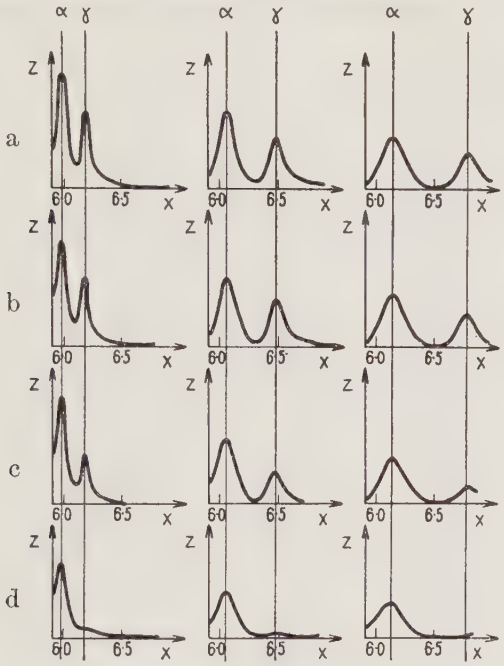
so unterscheidet sich der Wert der Sedimentationskonstante, ca. 2, mehr von dem für α normalen, 2,5, als was wahrscheinlich auf Versuchsfehlern beruhen kann. Sie scheint also zerfallen zu sein. Man muss hier jedoch in Rechnung setzen, dass der niedrigere Wert auch darauf beruhen kann, dass beim Zerfall der γ-Komponente Produkte entstanden sind, die störend auf den von der α-Komponente verursachten Konzentrationsgradienten einwirken.

Aus dem Versuch bei pH 11,9 geht folglich hervor, das mindestens die γ-Komponente beträchtlich zerfallen ist. Um mehr ins Einzelne gehende Kenntnis zu erhalten, bedarf es doch eingehenderer Versuche. Von besonderem Interesse wäre es zu untersuchen, ob der in den Sedimentationsdiagrammen wahrnehmbare Gipfel, dessen Sedimentationskonstante etwa 5 ist, als ein definiertes Dissoziationsprodukt, möglicherweise Halbmoleküle, von γ angesehen werden kann.

Nach den Sedimentationsdiagrammen zu urteilen sind beim pH 12,6 α und γ vollständig zerfallen. Die im Sedimentationsdiagramm hervortretenden Gipfel haben die ungefähren Sedimentationskonstanten 1 und 3,5.

In Tabelle 2 und Figur 13 sind die Versuche über die Stabilität von α und γ in sauern Lösungen zusammengefasst. Bei der Dialyse der Ausgangslösung (pH 7,0, Fig. 13 a) gegen Puffer nie-

dereren pH's, fiel ein Teil der Globuline aus. In Übereinstimmung mit dem früher über die Löslichkeitsverhältnisse dieser Komponenten Gesagten, fiel beim Senken des pH's in erster Linie γ aus. Ausser dieser durch die Löslichkeit bedingten Zusam-



Figur 13.

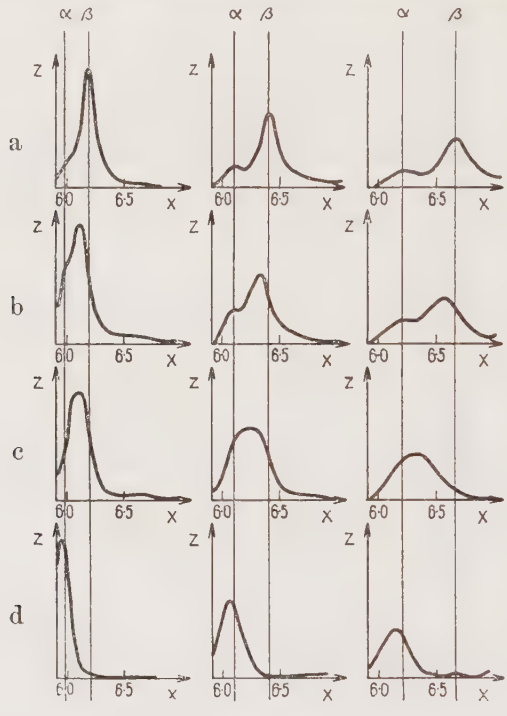
Sedimentationsdiagramme von Versuchen über die Stabilität der α- und β-Komponenten in sauren Lösungen.

a) pH 7,0. b) pH 5,9. c) pH 5,0. a) pH 4,0.

mensetzung der Lösung können keine Veränderungen wahrgenommen werden, die in diesem Intervall das Vorkommen von Zerfallsprodukten andeuten. Es muss jedoch betont werden, dass die Sedimentationskonstante der rascher sedimentierenden Komponente beim pH 4,0 wegen der äusserst geringen Konzentration nicht mit genügender Genauigkeit bestimmt werden konnte. Ihre Lage im Sedimentationsdiagramm scheint jedoch der γ-Komponente zu entsprechen.

Der Zerfall der β-Komponente im alkalischen Gebiet begann bei einem bedeutend niedrigeren pH als der der α- und γ-Komponenten. Dies geht aus den Versuchsresultaten in Tabelle 3 und

Figur 14 hervor. Die Ausgangslösung (Fig. 14 a) enthielt α und β, letzteres jedoch in überwiegender Menge. Die Sedimentationsdiagramme erlaubten jedoch in dieser Versuchsserie keine Bestimmung der relativen Menge der Komponenten. Die allgemeine Form der Sedimentationsdiagramme in Figur 14 b deutet



Figur 14.
Sedimentationsdiagramme von Versuchen über die Stabilität der β-Komponente in alkalischen Lösungen.
a) pH 7,0. b) pH 8,0. c) pH 8,9. d) pH 9,4.

doch schon bei pH 8 einen partiellen Zerfall von β an. Der niedere Wert der Sedimentationskonstanten deutet ebenfalls in dieser Richtung. Bei pH 8,9 (Fig. 14 c) ist der Zerfall so weit fortgeschritten, dass β nicht länger wahrgenommen werden kann, und die Durchschnitts-Sedimentationskonstante der nach allem zu urteilen uneinheitlichen Hauptmasse ist auf 4 bis 5 gesunken. Beim pH 9,4 kann man weiteren Zerfall wahrnehmen.

Nach diesen Versuchen scheint der Zerfall von β im alkalischen Gebiet meist in einem Abbau zu uneinheitlichen Produkten zu

bestehen. Auch in diesem Fall sind jedoch weitere Untersuchungen nötig, um eingehendere Kenntnis darüber zu gewinnen.

Stabilitätsuntersuchungen der β-Komponente in sauern Lösungen führte man im Zusammanhang mit gewissen Elektrophoreseversuchen durch. Diesen zufolge sollte β bis hinunter gegen pH 4 immer noch stabil sein.

Im Zusammenhang mit einer Versuchsserie die Konzentrationsabhängigkeit der Sedimentationskonstante von γ zu prüfen (vgl. S. 47), bestimmte man auch, soweit möglich, die relative Konzentration der in der Lösung enthaltenen Komponenten (α, γ und δ). Die Ausgangslösung verdünnte man sukzessiv ein paar Male aufs doppelte Volumen, bis die Proteinkonzentration auf 1/16 der Ursprungskonzentration gesunken war. Bei noch grösserer Verdünnung war die Sedimentation nicht mehr leicht zu verfolgen. Nach jeder Verdünnung führte man zwei Ultrazentrifugierungen aus, und die Resultate sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Soweit man beurteilen kann, kommt in diesen Versuchen bei der Verdünnung keine Dissoziation vor.

Tabelle 4.

Stabilität der α- und γ-Komponenten bei Verdünnung.

Konzentration $\alpha+\gamma+\delta$ in %	Relativkonzentration				s_α	s_γ
	α	γ	δ	$\gamma+\delta$		
1,56	0,27	0,58	0,15	0,73	2,48	7,60
0,78	0,26 0,25	0,56 0,59	0,18 0,17	0,74 0,75	2,61 2,58	8,19 7,91
0,39	0,25 0,24			0,75 0,76	2,61 2,42	8,10 8,18
0,20	0,26 0,23			0,74 0,77	2,72 2,56	8,24 8,11
0,10					2,59 2,48	8,16 8,25

Ein orientierender Versuch wurde zur Untersuchung der Möglichkeit einer Dissoziation durch Salzzusatz ausgeführt. Hier verwendete man eine α und γ enthaltende Lösung mit einer totalen Proteinkonzentration von ungefähr 1,4 %, als Lösungsmittel 0,2-m NaCl + 0,05-m Phosphat, pH 7,0. Diese Globulinlösung

dialysierte man gegen eine an NaCl 2-molare Lösung (gleiche Phosphatkonzentration und pH). Die ursprüngliche und die dialysierte Lösung analysierte man in der Ultrazentrifuge. Dadurch konnte man die relative α- und γ-Konzentration bestimmen, und man erhielt vor der Dialyse 0,54 für α und 0,46 für γ, nach der Dialyse 0,56 für α und 0,44 für γ. Der Unterschied liegt vollkommen innerhalb der Fehlergrenzen. Ebenfalls die Werte der Sedimentationkonstanten stimmen überein. Von einer Dissoziation konnte also nichts bemerkt werden.

KAP. IV.

Elektrophoretische Untersuchungen.

Die elektrophoretischen Untersuchungen der Gerstenglobuline wurden nach der Methode der wandernden Grenzfläche ausgeführt. Tiselius hat sie eingehend studiert und verbessert (siehe z. B. *44*, *45*, *46*), und man kann nun die elektrophoretische Beweglichkeit u und den isoelektrischen Punkt pH° mit grosser Genauigkeit bestimmen. Da sowohl u wie pH° sich als wohldefinierte und reproduzierbare Grössen erwiesen haben, kommt den elektrophoretischen Messungen eine grosse Bedeutung zu, als einem Mittel, die Proteine elektrochemisch zu charakterisieren.

Die Wanderung der Proteine im elektrischen Feld beruht auf ihrer Ladung. Am isoelektrischen Punkt ist die scheinbare Ladung gleich Null, und die Moleküle wandern weder gegen die Kathode noch gegen die Anode. Auf der sauren Seite des isoelektrischen Punkts ist die Ladung positiv, auf der alkalischen negativ, und die Wanderung geht gegen die Kathode resp. Anode.

Durch Bestimmung von u bei verschiedenen pH kann die Kurve konstruiert werden, die die Beziehung zwischen diesen beiden Grössen angibt. Der Schnittpunkt zwischen dieser Kurve und der pH-Achse stellt den isoelektrischen Punkt dar. Die Neigung der Kurve im isoelektrischen Punkt, $\left(\frac{du}{dpH}\right)^\circ$, kann ebenfalls als eine charakteristische Konstante betrachtet werden.

Die Beweglichkeit und damit auch der isoelektrische Punkt sind nicht nur vom pH abhängig. Die Salzkonzentration der Lösung und die Temperatur haben auch einen gewissen Einfluss. Als Beispiel sei erwähnt (*48*), dass der isoelektrische Punkt von Ovalbumin in Azetatpuffer bei 0,5° C von 4,710 auf 4,585 sinkt, wenn die Ionenstärke von 0,01 auf 0,1 erhöht wird. Bei der Ionenstärke 0.02 sinkt er von 4,65 auf 4,57, bei Erhöhung der Temperatur von 0,5° auf 20,0° C.

In dem von Tiselius konstruierten Elektrophoreseapparat (*45*,

46) können die Verschiebungen der Grenzflächen im elektrischen Feld refraktometrisch verfolgt werden mit Hilfe der Philpot-Svensson'schen Methode (*27*, *42*). Diese gibt ein direktes Bild der Variation des Konzentrationsgradienten in der Elektrophoresezelle. Gleich wie bei den Sedimentationsdiagrammen bei Ultrazentrifugierungen nach der Skalenmethode, treten die Grenzflächen als mehr oder minder deutlich markierte Maxima in der Gradientenkurve auf. Es ist jedoch zu beachten, dass die bei der Elektrophorese erhaltene Aufteilung nicht immer der entspricht, die bei der Ultrazentrifugierung derselben Lösung erhalten werden kann. Molekülarten mit verschiedener elektrophoretischer Wanderungsgeschwindigkeit können nämlich dieselbe Sedimentationsgeschwindigkeit haben und umgekehrt. Tiselius' Elektrophoreseapparat erlaubt eine Aufteilung der Versuchslösungen in Fraktionen nach Abschluss der Elektrophorese. Man bekommt dadurch die Möglichkeit, z. B. durch Ultrazentrifugierung verschiedene Komponenten zu identifizieren. Unter gewissen Bedingungen ist es weiter möglich, in einer Lösung enthaltene Komponenten mit verschiedener Wanderungsgeschwindigkeit vollständig zu trennen. Dies hat für präparative Arbeiten grosse Bedeutung bekommen.

Die elektrophoretischen Untersuchungen des Verfassers wurden in einem Apparat nach Tiselius und nach der von ihm ausgearbeiteten Methodik durchgeführt. Sie umfassten die α-, β- und γ-Komponenten. Die Ausgangslösungen waren Mischungen, welche hauptsächlich α und β, oder α und γ enthielten, zusammen mit einem Teil uneinheitlichen Materials. Die relative Konzentration der δ-Komponente war in allen Fällen so niedrig, dass sie sich dem elektrophoretischen Studium entzog. Es ist möglich, dass die verhältnismässig δ-reichen Lösungen hätten verwendet werden können, welche bei der Ultrazentrifugierung Sedimentationsdiagramme vom in Figur 11 wiedergegebenen Typus lieferten. Diese Fraktionen stellte man jedoch nur wenige Male her, und man erhielt sie in so kleinen Mengen, dass für eine elektrophoretische Versuchsserie nichts übrig blieb.

Bestimmung der isoelektrischen Punkte.

Die Elektrophoresen, welche zur Bestimmung der isoelektrischen Punkte der Gerstenglobuline dienten, wurden bei derselben Ionen-

stärke und Temperatur ausgeführt. Die Ionenstärke musste verhältnismässig hoch gewählt werden, 0,1, hauptsächlich wegen der Löslichkeitsverhältnisse der γ-Komponente. Bei pH-Werten höher als 5,5 verwendete man Phosphatpuffer, bei kleineren Azetatpuffer. Die Temperatur des Thermostaten wurde auf 0,5° C gehalten Die Lösung im U-rohr belastete man mit 0,20 bis 0,25 Watt/cm^3 bei sämtlichen Versuchen, und die durch den Strom verursachte geringe Erwärmung konnte für alle Versuche als gleich angesehen werden. Die Grösse des Potentialfalls variierte zwischen 7,5 und 9,5 Volt/cm.

Die spezifischen Leitvermögen der Lösungen, welche in die Berechnung von u eingehen, bestimmte man bei der Versuchstemperatur; die pH-Messungen führte man dagegen bei Zimmertemperatur aus. Der Unterschied beträgt jedoch bloss einige Hundertstel pH-Einheiten und ist daher bedeutungslos.

Die Maxima der Gradientenkurven, entsprechend den Lagen der Grenzflächen in der Elektrophoresenzelle, schienen eine grössere Verflachung zu erfahren als man durch Diffusion allein hätte erklären können. (Eine derartige Verflachung wurde früher auch bei andern Proteinen beobachtet.) Da ausserdem der Unterschied in den Wanderungsgeschwindigkeiten der in die Mischung eingehenden Komponenten verhältnismässig klein war, bereitete es Schwierigkeiten, die Verschiebung der Grenzflächen mit grösserer Genauigkeit zu verfolgen. Einige wesentliche Unterschiede in den Elektrophoresediagrammen der Kathoden- oder Anodenseite wurden nicht festgestellt, und die Werte der Beweglichkeiten u sind aus der Grenzflächenverschiebung auf beiden Seiten berechnet.

Die Resultate der elektrophoretischen Untersuchungen sind in Tabelle 5 und Figur 15 zusammengefasst, wo die Beweglichkeiten in $cm^2 \cdot Volt^{-1} \cdot sec^{-1}$ ausgedrückt sind. Die + und — Zeichen beziehen sich auf die Ladung des Proteins. Als Komplettierung dieser Tabelle kann das folgende erwähnt werden.

Die Ausgangslösungen der Versuche für das Studium der α-Komponente enthielten hauptsächlich α und γ. Mit Ausnahme des Versuchs beim pH 5,97, bei dem die Komponenten in ungefähr gleich grossen Mengen vorkamen, herrschte die α-Komponente vor. Die Lösungen hatten im grossen und ganzen dieselbe Zusammensetzung wie die Lösung, deren Sedimentationsdiagramm

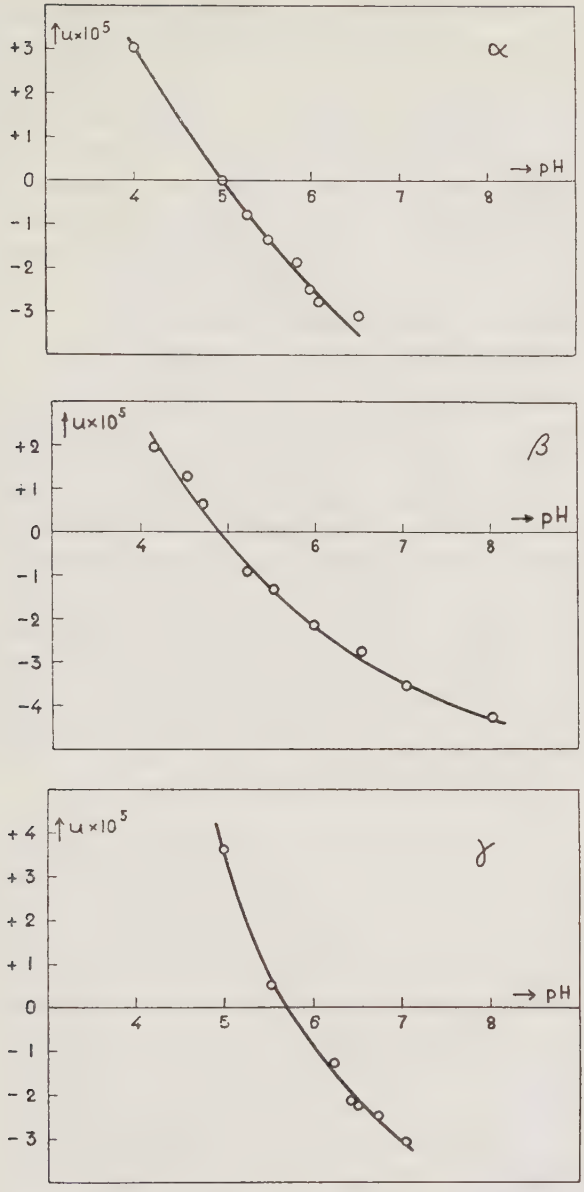
Tabelle 5.

Die elektrophoretische Beweglichkeit und die isoelektrischen Punkte der α-, β- und γ-Komponenten.

Komponente	Puffer	pH	$u \cdot 10^5$	$\left(\frac{du}{d\,pH}\right)^{\circ} \cdot 10^5$	Isoelektrischer Punkt
α	Acetat	4,00	+3,04	2,7	5,00
	»	4,99	±0,00		
	»	5,27	−0,70		
	Phosphat	5,51	−1,46		
	»	5,84	−1,94		
	»	5,97	−2,50		
	»	6,07	−2,80		
	»	6,53	−3,11		
β	Acetat	4,14	+1,92	2,7	4,90
	»	4,52	+1,13		
	»	4,72	+0,62		
	»	5,22	−0,92		
	Phosphat	5,52	−1,35		
	»	5,97	−2,15		
	»	6,53	−2,77		
	»	7,02	−3,55		
	»	8,03	−4,27		
γ	Acetat	4,99	+3,56	3,2	5,70
	Phosphat	5,51	+0,29		
	»	6,18	−1,28		
	»	6,43	−2,14		
	»	6,50	−2,28		
	»	6,78	−2,50		
	»	7,05	−3,07		

in Figur 9 b wiedergegeben ist. Gleich wie bei den Ultrazentrifugierungen α-reicher Ausgangslösungen zeigte das Elektrophoresediagramm eine Hauptkomponente. Die Verbreiterung der Grenzfläche war ziemlich bedeutend, aber irgend eine Andeutung einer elektrophoretischen Aufteilung von α konnte nicht wahrgenommen werden. Beigefügt sei, dass eine Anzahl Elektrophoresefraktionen zentrifugiert wurden, wobei eine Kontrolle ergab, dass die bei der Elektrophorese beobachtete Hauptkomponente die α-Komponente enthielt.

Beim Studium der β-Komponente verwendete man Lösungen, die α und β enthielten, letztere doch in überwiegender Menge. Aus den Sedimentationsdiagrammen in Figur 6 b gewinnt man am ehesten eine Auffassung über die Zusammensetzung dieser



Figur 15.

Diagramme über die Beziehung zwischen elektrophoretischer Beweglichkeit und pH für die α-, β- und γ-Komponenten.
Der isoelektrische Punkt ist durch den Schnittpunkt von Kurve und pH-achse gekennzeichnet.

Lösungen. Im Elektrophoresediagramm trat auch in diesem Fall eine Hauptkomponente auf. Ultrazentrifugierung der Elektrophoresefraktion zeigte jedoch, dass sie sowohl α wie β enthielt. Eine elektrophoretische Trennung konnte nicht mit Sicherheit festgestellt werden. Da die Menge der β-Komponente bedeutend grösser war als die von α, und da sie praktisch mit der gleichen Geschwindigkeit wanderten, so dürfte kein wesentlicher Fehler dadurch entstanden sein, dass man die Wanderung der aus α und β zusammengesetzten Hauptkomponenten der Berechnung der Beweglichkeit von β zugrunde legte.

Um die Beweglichkeit der γ-Komponente zu bestimmen, verwendete man Lösungen, die eine Mischung der α- und γ-Komponenten enthielten. (Vgl. Fig. 9 c.) Im Versuch, der bei pH 6,50 ausgeführt wurde, waren die Konzentrationen der beiden Komponenten ungefähr gleich, in den andern überwog die Menge von γ. Bei den in den Elektrophoreseversuchen herrschenden Bedingungen ist die Löslichkeit der γ-Komponente wesentlich kleiner als die der α-Komponente, besonders bei niedrigerem pH. Es ist daher von Bedeutung, die Ausgangslösungen hinreichend zu verdünnen, bevor sie gegen den Puffer dialysiert werden, der zur Elektrophorese verwendet werden soll. Man riskiert sonst eine Verschiebung des Konzentrationsverhältnisses in einer für die Beobachtung von γ unvorteilhaften Weise.

Separierungsversuche.

Schliesslich sollen noch eine Anzahl Versuche erwähnt werden, welche in der Absicht ausgeführt wurden, zu möglichst reinen α- resp. γ-Fraktionen zu gelangen.

Eine elektrophoretische Trennung gründet sich auf den Unterschied in den Wanderungsgeschwindigkeiten der Komponenten. Um zu verhindern, dass die Grenzflächen während der für eine genügende Trennung erforderlichen Zeit aus dem U-rohr herauswandern, hat Tiselius ein Kompensationsverfahren eingeführt. Dies beruht im Prinzip darauf, die Lösung in der der Wanderungsrichtung der Komponenten entgegengesetzten Richtung durch das U-rohr fliessen zu lassen.

Es ist eine Voraussetzung für die praktische Durchführbarkeit der elektrophoretischen Trennung, dass sich die Grenzschicht

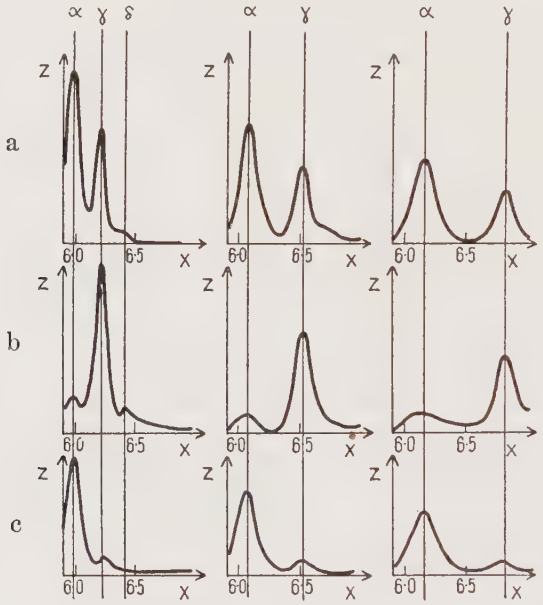
während der Elektrophorese nicht zu stark verbreitert. Es hat sich gezeigt, dass es gerade diese Verbreiterung ist, die der elektrophoretischen Trennungsmöglichkeit eine Grenze setzt.

Bei einem Elektrophoreseversuch zur Bestimmung der elektrophoretischen Beweglichkeit darf man nicht mit allzu grossen Proteinkonzentrationen arbeiten. Bei der Trennung ist dagegen eine hohe Konzentration zur Gewinnung einer grossen Ausbeute wünschenswert. Bei der Ionenstärke (0,1) und Temperatur (0,5° C), die vorher bei der Bestimmung der Wanderungsgeschwindigkeiten der α- und γ-Komponenten herrschten, war speziell die Löslichkeit der γ-Komponente zur rationellen Durchführung eines Trennungsversuches zu klein. U. a. war es nicht möglich, die Grenzflächen während so langer Zeit zu beobachten, dass Kompensation und Zeit für die Trennung in passender Weise bemessen werden konnten. Die zu erwartende Ausbeute war ebenfalls sehr wenig zufriedenstellend. Aus diesem Grund führte man eine Anzahl Versuche bei höherem Salzgehalt und Temperatur durch, wenn schon eine solche Erhöhung aus anderen Gesichtspunkten als unzweckmässig angesehen werden muss.

Als Beispiel einer dieser Trennungselektrophoresen soll ein bei +5° C und Ionenstärke 0,26 vorgenommener Versuch ausgewählt werden. Der verwendete Phosphatpuffer war 0,2-m an NaCl. Das pH war 5,9. Trotz der grösseren Löslichkeit der Komponenten bei höherem pH waren doch, wie die Versuche zeigten, die Trennungsbedingungen bei dem gewählten niederen pH günstiger, wegen des grösseren Unterschieds in den Wanderungsgeschwindigkeiten der Komponenten. Die Belastung betrug bis 0,20 Watt/cm^3, was den vorher mitgeteilten Versuchen entspricht. Wegen der grösseren Leitfähigkeit entsprach diesem Effekt bloss ein Potentialgefälle von 3,5 Volt/cm.

Nach 2—3 Stunden konnte eine deutliche Trennung wahrgenommen werden. Die Grenzflächen traten bei dieser und andern unter diesen Bedingungen ausgeführten Elektrophoresen deutlicher auf der Anoden- als auf der Kathodenseite hervor. Auf der Anodenseite konnte die Wanderung während etwa 18 Stunden verfolgt werden. Gegen das Ende dieser Zeit waren doch die Gipfel in der Gradientenkurve sehr verbreitert und überdeckten einander immer noch teilweise. Auf der Kathodenseite war dagegen die Grenzschicht schon nach ungefähr 12

Stunden so diffus, dass die Wanderung der Komponenten nicht länger beobachtet werden konnte. Man kompensierte zweimal, indem man die im Versuch beobachtete Wanderungsgeschwindigkeit berücksichtigte. Der Versuch war während 39 Stunden im Betrieb und nach der Berechnung sollten da zwei der Zellen des Elektrophoreseapparates, die eine auf der Kathoden-, die



Figur 16.

Sedimentationsdiagramme von Lösungen, die bei der elektrophoretischen Trennung der α- und γ-Komponenten erhalten wurden.

a) Ausgangslösung.
b) Lösung von der Kathodenseite.
c) Lösung von der Anodenseite.

andere auf der Anodenseite praktisch reines γ resp. α enthalten. Diese Fraktionen trennte man ab und ultrazentrifugierte sie dann, wobei die in Figur 16, b und c, wiedergegebenen Sedimentationsdiagramme erhalten wurden. Das Sedimentationsdiagramm Figur 16 a entspricht der Ausgangslösung.

Wie aus Figur 16 hervorgeht, erhielt man eine weitgehende Trennung. Mit der bei diesem und ähnlichen Versuchen gewonnenen Erfahrung scheint jedoch eine vollständige Trennung sehr schwierig zu sein.

Zuletzt kann hervorgehoben werden, dass man bei den Trennungselektrophoresen eine gute Kontrolle erhielt, dass die bei den Versuchen zur Bestimmung der Beweglichkeit der α- und γ-Komponenten verfolgten Grenzflächen wirklich den betreffenden Komponenten entsprachen.

KAP. V.

Molekulargewichte und Diffusionskonstanten von Mischungen verschiedener Komponenten. Theorie.

Sedimentationsgleichgewicht.

Zentrifugiert man die Lösung einer monodispersen Substanz bis sich ein Gleichgewicht zwischen Sedimentation und Diffusion eingestellt hat, so kann man das Molekulargewicht der Substanz mit Hilfe der Formel (3, 4) bestimmen.

$$M = \frac{R\,T\,d\,c/d\,x}{(1 - V\varrho)\,\omega^2\,x\,c_x} = \frac{2\,R\,T \ln (c_2/c_1)}{(1 - V\varrho)\,\omega^2\,(x_2^2 - x_1^2)}. \qquad (3, 4)$$

Hier ist R = Gaskonstante,
T = absolute Temperatur,
V = spezifisches Volumen der Substanz,
ϱ = Dichte des Lösungsmittels,
ω = Winkelgeschwindigkeit,
c_1 und c_2 sind die Konzentrationen im Abstand x_1 und x_2 von der Rotationsachse.

Gleichung (3, 4) kommt bei der Absorptionsmethode zur direkten Anwendung, wo man die Konzentrationsverteilung in der Zelle aus experimentellen Daten bestimmt.

Bei der Lamm'schen Skalenmethode misst man dagegen bestimmte Skalenstrichverschiebungen Z in verschiedenen Teilen der Zelle. Diese Skalenstrichverschiebungen sind dem Konzentrationsgradienten proportional. Unter der Voraussetzung, dass die Substanz monodispers und das Brechungsindexinkrement $d\,n/d\,c$ innerhalb des im Versuch vorkommenden Konzentrationsbereichs konstant ist, hat Lamm gezeigt, dass

$$\frac{c_2}{c_1} = \frac{Z_2\,x_1}{Z_1\,x_2} \qquad (5)$$

ist. Hier bedeuten Z_1 und Z_2 die Skalenstrichverschiebungen in den Abständen x_1 und x_2 von der Rotationsachse. Für die Berechnung des Molekulargewichts erhält man folglich die Formel

$$M = \frac{2\,R\,T \ln (Z_2\,x_1 / Z_1\,x_2)}{(1 - V\varrho)\,\omega^2\,(x_2^2 - x_1^2)}. \qquad (6)$$

Ob man (3, 4) oder (6) der Berechnung des Molekulargewichts zugrunde legt, so erhält man natürlich, wenn es sich um eine monodisperse Substanz handelt, die gleichen Molekulargewichtswerte, ausgehend von Daten, die verschiedenen Höhen in der Zelle entsprechen. Ist die Substanz aber poly- oder paucidispers, so wachsen die berechneten Molekulargewichte mit dem Abstand von der Rotationsachse. Dieser Gang in den Werten beruht jedoch nicht nur auf der Art und der relativen Konzentration der Komponenten in der Mischung sondern ebenfalls in hohem Grade auf der Umdrehungszahl, bei der sich das Gleichgewicht eingestellt hat.

Kennt man die Konzentrationen und Molekulargewichte der in die Mischung eingehenden Molekülarten, so kann man die resultierende Konzentrations- oder Gradientenkurve unter den im Gleichgewicht herrschenden Bedingungen berechnen. Leider ist es nicht möglich, aus dem in einem Versuch in den berechneten Molekulargewichten erhaltenen Gang direkt auf die Arten und Gewichte der Moleküle in der Mischung zu schliessen. Die Zusammensetzung der Lösung kann nämlich in weiten Grenzen variieren und dennoch praktisch dieselbe Gradient- oder Konzentrationskurve ergeben.

Bei der Untersuchung poly- oder paucidisperser Systeme haben indessen Lansing und Kraemer gezeigt (*18*), dass man durch bestimmte Arten der Mittelwertsbildung Mittelwerte mit einer definierten physikalischen Bedeutung erhalten kann. Bei der Absorptionsmethode, wo die Konzentrationsverteilung in der Zelle der Berechnung zugrunde liegt, kann man durch Anwendung von (3, 4) den Wert des Gewichtsmittels M_w der in die Mischung eingehenden Molekülarten für verschiedene Schichten der Lösung erhalten. Geht man dagegen vom Gang des Konzentrationsgradienten in der Zelle aus, wie es bei der Skalenmethode der Fall ist, erhält man durch eine analoge Art der Berechnung

nach (6) den sogenannten Z-Mittelwert, M_z. Diese beiden Mittelwerte sind folgendermassen definiert:

$$M_w = \frac{\Sigma c_i M_i}{\Sigma c_i} \tag{7}$$

und

$$M_z = \frac{\Sigma c_i M_i^2}{\Sigma c_i M_i} \tag{8}$$

wo c_i die Konzentration der i-ten Molekülart und M_i das Molekulargewicht dieser Komponente bedeuten.

Pedersen hat eine Methode angegeben, die Konzentrationsverteilung in der Zelle bei Sedimentationsgleichgewichten aus den bei der Anwendung der Skalenmethode erhaltenen Skalenstrichverschiebungen zu berechnen (*25*). Dann kann man M_w auf die gleiche Weise berechnen wie bei einem Sedimentationsgleichgewicht nach der Lichtabsorptionsmethode. Der Verfasser hat jedoch gezeigt, dass es auch möglich ist, M_w aus den Skalenstrichverschiebungen direkt zu erhalten, ohne den Umweg zu machen, den die Bestimmung der Konzentrationsverteilung darstellt. Die Methode ist vom Verfasser nicht publiziert worden, sie ist aber in ihren Hauptzügen von Kraemer in Svedberg und Pedersens Monographie referiert (*39*, *a*, *b*). Hier sollen nur die Gleichungen angegeben werden, nach denen M_w berechnet werden kann, wenn man die Lösung in einer sektorförmigen oder parallelwandigen Zelle zentrifugiert.

Verwendet man eine sektorförmige Zelle, so berechnet man M_w nach der Gleichung

$$M_w = \frac{2RT}{k\alpha(1 - V\varrho)\omega^2 C(x_n^2 - x_o^2)} \int_{x_o}^{x_n} Z\,dx \tag{9}$$

oder

$$M_w = \frac{2RT\bar{Z}}{k\alpha(1 - V\varrho)\omega^2 C(x_n + x_o)} \tag{10}$$

wo $\bar{Z}$ der Mittelwert der Skalenstrichverschiebungen in der Zelle ist, C die Konzentration der Lösung, α das Brechungsindexinkrement, x_0, x_n die Abstände vom Rotationszentrum bis zum Meniskus, resp. Zellboden und k eine Apparatenkonstante.

Für eine parallelwandige Zelle erhält man

$$M_w = \frac{R\,T}{k\,\alpha\,(1 - V\varrho)\,\omega^2 C\,(x_n - x_o)} \int_{x_o}^{x_n} \frac{Z}{x}\,dx \qquad (11)$$

oder

$$M_w = \frac{R\,T\,\overline{Z/x}}{k\,\alpha\,(1 - V\varrho)\,\omega^2 C} \qquad (12)$$

wo $\overline{Z/x}$ der Mittelwert der erhaltenen Z/x-Werte ist.

Aus den Gleichungen (7) und (8) geht hervor, dass es im Prinzip möglich ist, das Molekulargewicht für eine gewisse in der Mischung vorhandene Komponente zu berechnen, wenn man die Molekulargewichte der andern und die relative Konzentration sämtlicher Komponenten kennt. Es muss jedoch betont werden, dass in der Praxis diese Möglichkeit stark auf der Zusammensetzung der Lösung beruht. In gewissen Fällen ist es vorteilhafter M_w den Berechnungen zugrunde zu legen, in andern M_z.

Da man relativ leicht eine teilweise Trennung der Gerstenglobuline erhält, es jedoch mit beträchtlichen Schwierigkeiten verbunden ist, sie vollständig aufzuteilen, sind die Möglichkeiten, das Molekulargewicht einer gewissen Komponente zu bestimmen durch Ausführung einer Gleichgewichtsbestimmung an der Mischung, Gegenstand einer näheren Untersuchung geworden. In der Folge wird die Komponente, deren Molekulargewicht bestimmt werden soll, als Hauptkomponente betrachtet, die übrigen als Verunreinigungen.

Wir wollen daher zuerst untersuchen, unter welchen Bedingungen M_w und M_z als annehmbare Werte für das Molekulargewicht der Hauptkomponente betrachtet werden können. Wir beginnen mit der Behandlung eines Systems mit nur zwei einheitlichen Komponenten.

Man kann leicht zeigen, dass M_w immer kleiner als M_z ist. Da diese beiden Mittelwerte stets zwischen den Molekulargewichtswerten der Komponenten liegen müssen, so ist es klar, dass das Molekulargewicht der leichteren Komponente am ehesten mit M_w übereinstimmt, das der schwereren mit M_z.

Die folgenden Bezeichnungen werden eingeführt:

M_o = Molekulargewicht der Hauptkomponente,
M_1 = Molekulargewicht der Verunreinigung,
a_o = relative Konzentration der Hauptkomponente,
$p = M_1/M_o$.

Aus (7) und (8) folgt da, dass

$$\frac{M_w}{M_o} = p(1 - a_o) + a_o \tag{13}$$

und

$$\frac{M_z}{M_o} = \frac{p^2(1 - a_o) + a_o}{p(1 - a_o) + a_o}. \tag{14}$$

Halten wir a_o konstant, so geht aus dem obigen Ausdrucke hervor, dass M_w/M_o eine lineare Funktion von p ist. Die Beziehung zwischen M_z/M_o und p stellt eine Hyperbel dar. Betrachten wir den Teil der Funktion, der eine physikalische Bedeutung hat, so ist es wichtig zu beachten, dass M_z/M_o immer ein Minimum für einen Wert von p hat, der kleiner als $^1/_2$ ist. Dieser p-Wert ist von a_o abhängig. Je kleiner a_o, desto geringer wird der p-Wert, der dem Minimum von M_z/M_o entspricht. So liegt, wenn die Konzentration der leichteren Komponente — in diesem Fall der Verunreinigung — kleiner als die der schwereren ist, der betreffende p-Wert zwischen $^2/_3$ und $^1/_2$. Für kleinere als dem Minimalwert M_z/M_o entsprechende p-Werte wird M_z/M_o grösser, je kleiner p ist. Nähert sich p dem Grenzwert 0, so strebt M_z/M_o dem Grenzwert 1 zu. Das ist von grosser praktischer Bedeutung, denn es kann zum Beispiel eine Lösung mit einer einheitlichen Hauptkomponente beträchtliche Mengen einer Verunreinigung mit hinreichend niederem Molekulargewicht enthalten, ohne dass sich der Z-Mittelwert nennenswert vom Molekulargewicht der Hauptkomponente unterscheidet. Im Gegensatz dazu wird der Gewichtsmittelwert M_w umso mehr vom Molekulargewicht der Hauptkomponente abweichen, je geringer das Molekulargewicht der Verunreinigung ist. M_w/M_o ist ja, wie wir soeben erwähnten, eine lineare Funktion von p.

Um ein Beispiel zu geben, nehmen wir an, die Lösung einer einheitlichen Hauptkomponente enthalte eine Verunreinigung,

deren Molekulargewicht ein Zehntel von dem der Hauptkomponente, und deren Konzentration 10 % der Totalkonzentration ausmache. Für diese Mischung wird M_z nur 1 % unter dem der Hauptkomponente liegen. Würde die Konzentration der Verunreinigung sogar 20 % betragen, so läge doch M_z nicht mehr als 2 % unter dem Molekulargewicht der Hauptkomponente.

Unter den genannten Konzentrationsverhältnissen und der Voraussetzung, dass M_1 kleiner als M_o ist, können die prozentualen Beträge, mit denen M_z von M_o abweicht, 2,6 %, resp. 5,6 % erreichen. In beiden Fällen erhält man diese maximalen Abweichungen, wenn das Molekulargewicht der Verunreinigung nahezu die Hälfte des Wertes der Hauptkomponente ausmacht.

Zum Vergleich werden wir nun sehen, in welchem Mass der Wert des Gewichtsmittels von dem der Hauptkomponente abweicht. Wir betrachten wie im obigen Beispiel den Fall, wo das Molekulargewicht der Verunreinigung kleiner als das der Hauptkomponente ist. Da M_w immer kleiner als M_z ist, so wird in diesem Fall M_w ein schlechterer Näherungswert für M_o sein als M_z es ist. Zum Unterschied von M_z/M_o wird M_w/M_o umso mehr von 1 abweichen, je kleiner p ist. Für den Grenzwert $p = 0$ wird $M_w/M_o = a_o$. Ist das Molekulargewicht der Verunreinigung im Verhältnis zu dem der Hauptkomponente sehr klein, wird folglich der Gewichtsmittelwert das Molekulargewicht der Hauptkomponente um einen prozentuellen Betrag untersteigen, der numerisch der prozentualen Konzentration der niedermolekularen Verunreinigung gleich ist. Nehmen wir wie vorhin das Molekulargewicht der Verunreinigung zu $^1/_{10}$ von dem der Hauptkomponenten an, so wird M_w 9 % resp. 18 % unter dem Molekulargewicht der Hauptkomponente liegen, für den Fall, dass die Konzentration der Verunreinigung 10 % resp. 20 % der Totalkonzentration beträgt. Im genannten Beispiel weicht folglich M_w nahezu 10 mal mehr von M_o ab als M_z.

Das Vorausgegangene kann in Kürze folgendermassen zusammengefasst werden: Ist das Molekulargewicht der Verunreinigung kleiner als das der Hauptkomponente M_o, so kann der Z-Mittelwert oft als ein guter Näherungswert für M_o betrachtet werden. Dies gilt besonders, wenn M_1 viel kleiner als M_o ist. Auch der Gewichtsmittelwert kann hie und da annehmbar sein. M_w ist jedoch immer ein schlechterer Näherungswert als

M_z und die Übereinstimmung wird, im Gegensatz zu dem, was bei M_z der Fall war, schlechter, je kleiner M_1 im Verhältnis zu M_o ist.

Wir gehen nun zum Fall über, wo das Molekulargewicht der Verunreinigung grösser als das der Hauptkomponente ist. Nach dem vorher Gesagten bildet M_w den besseren Näherungswert. Es muss jedoch betont werden, dass die Voraussetzungen, damit M_w als ein annehmbarer Wert für M_o betrachtet werden kann, weniger günstig sind, wenn M_1 grösser als M_o ist, als für M_z, wenn M_1 kleiner als M_o ist. Um dies noch deutlicher zu machen, betrachten wir zwei Lösungen eines einheitlichen Stoffes, von denen die erste eine Verunreinigung mit einem p mal grösseren Molekulargewicht enthalte und die zweite mit einer Verunreinigung, deren Molekulargewicht p mal kleiner als das der Hauptkomponente sei. Die relative Konzentration der Hauptkomponente a_o nehmen wir in beiden Fällen als gleich gross an. Unter der Voraussetzung $p > 1$ ist folglich M_w der bessere Näherungswert im ersten Fall und M_z im zweiten. Bezeichnen wir mit Δ_w und Δ_z die Beträge, mit denen sich M_w resp. M_z von M_o unterscheiden in den verschiedenen Fällen, erhält man

$$\frac{\Delta_w}{\Delta_z} = p\,[1 + a_o(p - 1)]. \tag{15}$$

Daraus geht hervor, dass Δ_w unter den gegebenen Voraussetzungen $p > 1$ immer zwischen p und p^2 mal so gross ist wie Δ_z.

Wir sahen eben, im Fall $p < 1$, dass auch dann, wenn die Konzentration der Verunreinigung 20 % der Totalkonzentration betrug, sich M_z im ungünstigsten Fall ($p \sim 1/2$) nicht viel mehr als 5 % von M_o unterscheidet. Als Vergleich werden wir nun im Fall $p > 1$ angeben, wie hoch die Konzentration der Verunreinigung sein darf, damit M_w nicht mehr als 5 % von M_o verschieden ist. Setzen wir beispielsweise $p = 2,\ 4,\ 10$, so finden wir die fraglichen Konzentrationen zu 5 %, 1,7 % und 0,56 % der Totalkonzentration. Für M_z werden natürlich die entsprechenden Konzentrationen bedeutend geringer. Für die obigen Werte von p finden wir auf diese Weise die Werte 1,6 %, 0,40 % und 0,060 %. Wir sehen daher, wie äusserst empfindlich M_z für kleine Mengen eines Stoffes ist, dessen Molekulargewicht im Verhältnis zu

M_o hoch ist. Als weiteres Beispiel kann erwähnt werden, dass für $p = 10$ die Konzentration der Verunreinigung nur 1,2 % der Totalkonzentration zu sein braucht, damit M_z doppelt so gross wie M_o wird!

Aus diesen Beispielen dürfte hervorgehen, dass M_w für $p > 1$ nur dann als ein Näherungswert für das Molekulargewicht der Hauptkomponente betrachtet werden kann, wenn die relative Konzentration der Verunreinigung sehr klein und ihr Molekulargewicht nicht wesentlich höher als das der Hauptkomponente ist. Was M_z betrifft, so weicht es, speziell bei hohen Werten von p bedeutend mehr von M_o ab als M_w. Wenn $p > 1$, ist daher M_z in der Regel vollkommen unbrauchbar als Näherungswert von M_o.

Bisher betrachteten wir einzig Lösungen mit zwei einheitlichen Komponenten. Wir gehen nun zu solchen über, die ausser der einheitlichen Hauptkomponente eine willkürliche Anzahl Verunreinigungen enthalten Es ist dabei gleichgültig, ob die Verunreinigungen poly- oder paucidispers sind.

Wie vorher nehmen wir an, dass das Molekulargewicht der Hauptkomponente M_o sei, deren relative Konzentration a_o, Gewichts- resp. Z-Mittelwert sämtlicher Komponentenmolekulargewichte M_w resp. M_z. Ausserdem führen wir folgende neue Bezeichnungen ein:

M_{iw} = Gewichtsmittelwert der Molekulargewichte sämtlicher Verunreinigungen,

M_{iz} = Z-Mittelwert der Molekulargewichte sämtlicher Verunreinigungen,

$p_{iw} = M_{iw}/M_o$,

$p_{iz} = M_{iz}/M_o$.

Ausgehend von den Definitionen für M_w und M_z, Gleichung (7) und (8), können wir die (13) und (14) entsprechenden Ausdrücke bilden

$$\frac{M_w}{M_o} = p_{iw}(1 - a_o) + a_o \tag{16}$$

und

$$\frac{M_z}{M_o} = \frac{p_{iz}^2(1 - a_o) + a_o}{p_{iz}(1 - a_o) + a_o}(1 + \Delta) \tag{17}$$

wo

$$\Delta = \frac{a_o(1 - p_{iz})(p_{iz} - p_{iw})}{[p_{iz}^2(1 - a_o) + a_o][p_{iw}(1 - a_o) + a_o]}.$$

(16) unterscheidet sich von (13) nur dadurch, dass p durch p_{iw} ersetzt ist. Das bedeutet, M_w weicht gleich viel von M_o ab, gleichgültig ob die Hauptkomponente mit einer gewissen Menge einer uneinheitlichen Substanz verunreinigt ist oder mit einer prozentual gleich grossen Menge einer einheitlichen, deren Molekulargewicht mit dem Gewichtsmittel der Molekulargewichte der in der uneinheitlichen Substanz enthaltenen Molekülarten übereinstimmt. Das oben über die Beziehung zwischen M_w und M_o Erwähnte für den speziellen Fall, dass die Verunreinigung einheitlich sei, gilt da auch für den allgemeinen Fall, wo die Verunreinigung aus einer willkürlichen Anzahl Molekülarten besteht.

Was (17) betrifft, so stimmt der erste Faktor, der Bruch, mit (14) überein, mit der Ausnahme, dass p gegen p_{iz} ausgetauscht ist. Ausserdem enthält (17) den Faktor $1 + \Delta$. Man beachte, dass Δ auch eine Funktion von p_{iw} ist. Für $p_{iz} < 1$ wird $\Delta > 0$ und folglich $1 + \Delta > 1$. Für $p_{iz} > 1$ wird dagegen $\Delta < 0$ und $1 + \Delta < 1$.

Es wurde nun oben gezeigt, dass M_z unter gewissen Bedingungen als ein guter Näherungswert für M_o betrachtet werden kann, im Fall wo die Hauptkomponente mit einer einheitlichen Substanz verunreinigt ist, deren Molekulargewicht niedriger als das der Hauptkomponente ist. Für die uneinheitliche Verunreinigung entspricht dem der Fall, wo der Z-Mittelwert der Molekulargewichte sämtlicher Verunreinigungen geringer als das Molekulargewicht der Hauptkomponente ist. p_{iz} wird kleiner als 1 und folglich Δ positiv. Daraus geht hervor, dass M_z/M_o grösser wird, wenn die Hauptkomponente mit einer uneinheitlichen Substanz verunreinigt ist, als mit einer einheitlichen vom Molekulargewicht M_{iz}. Unter den gegebenen Voraussetzungen wird M_z ein noch besserer Näherungswert für M_o, wenn die Verunreinigung uneinheitlich ist als es für die einheitliche hergeleitet wurde. Es beruht natürlich auf dem Wert von Δ, wie viel besser die Übereinstimmung wird. Es sei erwähnt, dass Δ immer kleiner als M_{iz}/M_o wird, wenn M_{iz} kleiner als M_o ist.

Wir haben nun gesehen, unter welchen Voraussetzungen M_w

und M_z annehmbare Näherungswerte für das Molekulargewicht der Hauptkomponente in einer Mischung liefern. Daher können wir nun auch eine Auffassung über den Reinheitsgrad bekommen, den eine Substanz haben muss, damit man mit hinreichend grosser Genauigkeit ihr Molekulargewicht durch Anwendung der für einheitliche Substanzen geltenden Gleichungen (3, 4) und (6) bestimmen kann. Gelten diese Gleichungen wegen der Uneinheitlichkeit der Substanz nicht mehr, so ist es wie gesagt möglich, (7) und (8) der Berechnung zugrunde zu legen. Es beruht in hohem Grad auf der Art der Mischung, mit wie grosser Genauigkeit man notwendigerweise die Molekulargewichte der Verunreinigungen und deren relative Konzentrationen kennen muss. Sie bedingt auch, ob man für die Berechnung von M_w oder M_z ausgehen soll. Ist der Z-Mittelwert M_{iz} der Molekulargewichte sämtlicher Verunreinigungen geringer als das Molekulargewicht der Hauptkomponente M_o, so soll man zweckmässig von M_z ausgehen, im entgegengesetzten Fall von M_w. (Vgl. die Bedingungen unter denen M_z resp. M_w den besseren Näherungswert für M_o darstellen.)

In der Folge wollen wir nun die Möglichkeiten etwas näher untersuchen, um in der Praxis M_w oder M_z zur Berechnung des Molekulargewichts der Hauptkomponente zu verwenden. Wir nehmen dazu an, die Mischung enthalte eine willkürliche Anzahl n Verunreinigungen, wovon jede als einheitliche Substanz betrachtet werden kann. Die relative Konzentration der i-ten Verunreinigung sei a_i. Mit den früher eingeführten Bezeichnungen können wir nach (7) und (8)

$$M_w = a_o M_o + \sum_{i=1}^{n} a_i M_i = a_o M_o + (1 - a_o) M_{iw} \tag{18}$$

und

$$M_z = \frac{a_o M_o^2 + \sum_{i=1}^{n} a_i M_i^2}{a_o M_o + \sum_{i=1}^{n} a_i M_i} = \frac{a_o M_o^2 + (1 - a_o) M_{iw} M_{iz}}{a_o M_o + (1 - a_o) M_{iw}} \tag{19}$$

setzen. Aus (18) und (19) erhält man

$$M_o = \frac{M_w - (1 - a_o) M_{iw}}{a_o} \tag{20}$$

und

$$M_o = \frac{1}{2}\left[M_z \pm \sqrt{M_z^2 + \frac{4(1 - a_o)}{a_o} M_{iw}(M_z - M_{iz})} \right] \tag{21}$$

Das Pluszeichen vor der Wurzel in (21) wird angewendet, wenn

$$a_o > \frac{M_{iz}(M_{iz} - 2M_o)}{(M_{iz} - M_o)^2}$$

während man das Minuszeichen verwendet, wenn a_o kleiner als dieser Ausdruck ist. Wie soeben erwähnt, braucht man (21) hauptsächlich, wenn $M_{iz} < M_o$. Da a_o immer positiv ist, muss in diesem Fall stets das Pluszeichen gesetzt werden.

Durch die Fehlerberechnung bekommt man aus (18)

$$\left|\frac{\Delta M_o}{M_o}\right| = (1 + q p_{iw})\left|\frac{\Delta M_w}{M_w}\right| + \left| - q p_{iw} \frac{\Delta M_{iw}}{M_{iw}}\right| + \\ + \left| - (1 - p_{iw}) \frac{\Delta a_o}{a_o}\right| \tag{22}$$

und aus (19)

$$\left|\frac{\Delta M_o}{M_0}\right| = \left|\frac{(1 + q p_{iw})(1 + q p_{iw} p_{iz})}{1 + q p_{iw}(2 - p_{iz})} \frac{\Delta M_z}{M_z}\right| + \left|\frac{q p_{iw}(1 - p_{iz})}{1 + q p_{iw}(2 - p_{iz})} \frac{\Delta M_{iw}}{M_{iw}} - \right.$$

$$\left. - \frac{q p_{iw} p_{iz}(1 + q p_{iw})}{1 + q p_{iw}(2 - p_{iz})} \frac{\Delta M_{iz}}{M_{iz}}\right| + \\ + \left| - \frac{q p_{iw}(1 - p_{iz})}{(1 - a_o)[1 + q p_{iw}(2 - p_{iz})]} \frac{\Delta a_o}{a_o}\right| \tag{23}$$

wo

$$q = \frac{1 - a_o}{a_o}.$$

Mit Hilfe von (22) und (23) können wir die Genauigkeit beurteilen, mit der man M_o in einem gegebenen Fall aus (20) und (21) berechnen kann und in gleicher Weise entscheiden, unter welchen Bedingungen es überhaupt möglich ist, M_o mit genügender Genauigkeit zu bestimmen. Hier verschiedene Fälle im ein-

zelnen zu diskutieren würde jedoch zu weit führen. Eine speziell wichtige Frage soll doch behandelt werden; wir wollen untersuchen, wie genau wir notwendigerweise in verschiedenen Fällen die Molekulargewichte der in der Mischung vorhandenen Verunreinigungen kennen müssen. Wir betrachten den Fall, dass die Verunreinigung aus einem einzigen, einheitlichen Stoff bestehe. Sein Molekulargewicht wird mit M_1 und M_1/M_o mit p bezeichnet. Unter den gegebenen Voraussetzungen können wir in (22) und (23) $M_{iw} = M_{iz} = M_1$ setzen und $p_{iw} = p_{iz} = p$. Da wir nur den durch einen Fehler in M_1 in M_o verursachten Fehler untersuchen wollen, erhalten wir aus (22)

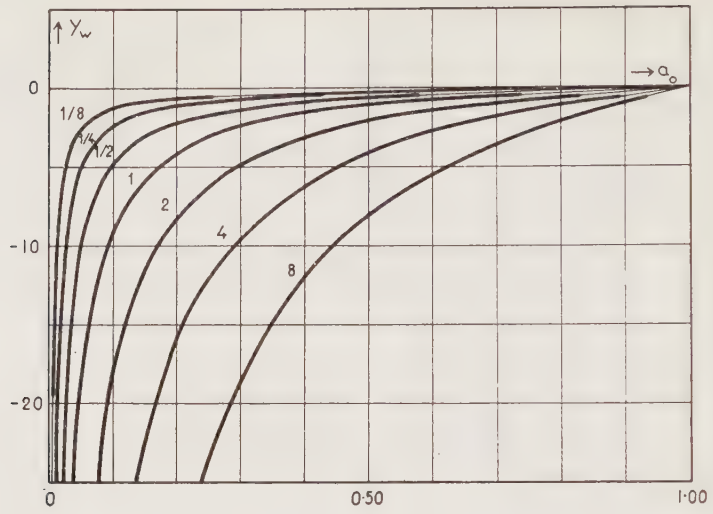
$$\left|\frac{\Delta M_o}{M_o}\right| = \left|-qp\frac{\Delta M_1}{M_1}\right| \tag{24}$$

und aus (23)

$$\left|\frac{\Delta M_o}{M_o}\right| = \left|qp\frac{(1-2p-qp^2)}{(1+2qp-qp^2)}\frac{\Delta M_1}{M_1}\right|. \tag{25}$$

Wir fassen zuerst den Fall ins Auge, wo man M_o aus M_1 und M_w berechnet. In Figur 17 ist das Verhältnis $\frac{\Delta M_o}{M_o}\Big/\frac{\Delta M_1}{M_1}$, welches der Kürze halber mit y_w bezeichnet sei, graphisch als Funktion von a_o für die p-Werte $^1/_8$, $^1/_4$, $^1/_2$, 1, 2, 4 und 8 dargestellt. Nur der Teil mit einer physikalischen Bedeutung ist gezeichnet ($0 < a_o < +1$). Die Kurven sind Teile von Hyperbelästen. Für alle Werte von p strebt y gegen $-\infty$, wenn a_o sich 0 nähert, und y wird 0, wenn $a_o = +1$. Aus der Figur sieht man, wie für jeden Zwischenwert von a_o y umso kleiner wird, je geringer p ist. Das bedeutet, dass die Genauigkeit, mit der man notwendigerweise das Molekulargewicht M_1 der Verunreinigung kennen muss, damit der Fehler in dem aus M_w und M_1 berechneten Molekulargewicht der Hauptkomponente einen gewissen, willkürlich gewählten Betrag nicht übersteigt, umso kleiner wird, je geringer das Molekulargewicht der Verunreinigung im Verhältnis zu dem der Hauptkomponente ist.

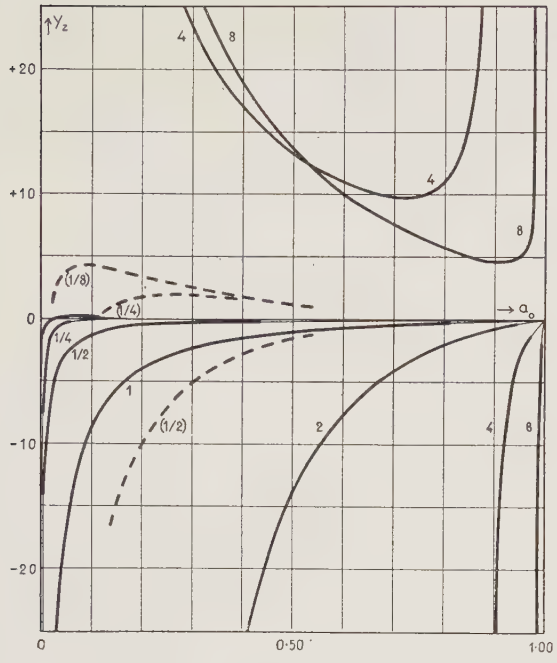
Wir gehen nun über zur Diskussion der Berechnungsmöglichkeit von M_o aus M_1 und M_z. $\frac{\Delta M_o}{M_o}\Big/\frac{\Delta M_1}{M_1}$ bezeichnen wir in diesem Fall mit y_z, und wie für y_w betrachten wir y_z als Funk-



Figur 17.

tion von a_o. In Figur 18 ist diese Funktion graphisch für die p-Werte $^1/_8$, $^1/_4$, $^1/_2$, 1, 2, 4, 8 dargestellt. Der Deutlichkeit wegen sind Teile der Kurven, die den p-Werten $^1/_8$, $^1/_4$ und $^1/_2$ entsprechen, auch mit 20 fach vergrösserter Ordinate aufgezeichnet. (Gestrichelte Kurven.) Was die Funktion $y_z = f(a_o, p)$ betrifft, müssen folgende allgemeine Eigenschaften hervorgehoben werden: Nähert a_o sich 0, geht y_z gegen $-\infty$ für $p < 2$ und gegen $+\infty$ für $p > 2$. Weiter wird für alle Werte von p $y_z = 0$, wenn $a_o = 1$. Für wachsende Werte von a_o nähert sich hierbei y_z dem Wert 0 von der positiven Seite, wenn $p < 2$ und von der negativen Seite für $p > 2$. Im vorliegenden Intervall $0 < a_o < +1$ durchläuft y_z für gewisse Werte von p ein Maximum oder Minimum. Das erste ist der Fall für $p < ^1/_2$, das zweite für $p > 2$. Je kleiner p, desto geringer ist der a_o-Wert, der diesem Extremwert entspricht.

Mit Hilfe der Figur 18 können wir nun in grossen Zügen einen Überblick für die Möglichkeiten bekommen, den Z-Mittelwert für die Berechnung des Molekulargewichts der Hauptkomponente zu verwenden. Ein Vergleich mit Figur 17 lehrt vorerst, dass der einem gewissen a_o entsprechende Wert von y_z bedeutend mehr mit p variiert als y_w. Die Genauigkeit der Berechnung von M_o aus M_1 und M_z beruht daher in höherem Grad auf



Figur 18.

dem Verhältnis der Molekulargewichte von Hauptkomponente und Verunreinigung, als wenn man M_o aus M_1 und M_w berechnet. Es ist von grosser praktischer Bedeutung, dass y_z für niedere Werte von p klein wird. Für $p < {}^1/_2$ wird beispielsweise immer $|y_z| < 0{,}1$, auch wenn a_o etwas kleiner als 0,5 sein sollte. Unter diesen Umständen ist es klar, dass M_z mit Vorteil der Berechnung von M_o zugrunde gelegt werden kann. Noch vorteilhafter werden die Verhältnisse für höhere Relativkonzentrationen der Hauptkomponente. Ist $a_o = 0{,}9$, wird $|y_z|$ von der Grössenordnung 0,01. Für grössere p-Werte werden dagegen die aus M_1 und M_z berechneten M_o-Werte äusserst unsicher, auch wenn M_1 mit grosser Genauigkeit bekannt ist.

Es geht schliesslich aus einem Vergleich von Figur 17 und 18 hervor, dass man das Gewichtsmittel zur Berechnung des Molekulargewichtes der Hauptkomponente verwenden soll, wenn das Molekulargewicht der Verunreinigung höher als das der Hauptkomponente, und den Z-Mittelwert, wenn es geringer ist. (Für den Grenzfall $p = 1$ fallen y_w und y_z zusammen.) Wir

sehen auch, dass die Möglichkeiten der Molekulargewichtsberechnung für die Hauptkomponente günstiger sind, wenn das Molekulargewicht der Verunreinigung kleiner als das der Hauptkomponente ist. Als Ergänzung zu den Figuren 17 und 18 wird die Tabelle 6 beigefügt. Die kursiv gedruckten Zahlen beziehen sich dabei auf y_z, die andern auf y_w.

Tabelle 6.

p \ a_0	0,10	0,25	0,50	0,75	0,90	0,95
1/8	−1,1	−0,38	−0,18	−0,042	−0,014	−0,0066
	+0,22	*+0,16*	*+0,074*	*+0,029*	*+0,010*	*+0,0049*
1/4	−2,3	−0,75	−0,25	−0,088	−0,028	−0,013
	−0,029	*+0,10*	*+0,076*	*+0,035*	*+0,013*	*+0,0064*
1/2	−4,5	−1,5	−0,50	−0,17	−0,056	−0,026
	−1,3	*−0,35*	*−0,071*	*−0,011*	*−0,0014*	*−0,0003*
1	−9,0	−3,0	−1,0	−0,33	−0,11	−0,053
	−9,0	*−3,0*	*−1,0*	*−0,33*	*−0,11*	*−0,053*
2	−18	−6,0	−2,0	−0,67	−0,22	−0,11
	−700	*−90*	*−14*	*−2,9*	*−0,77*	*−0,34*
4	−36	−12	−4,0	−1,3	−0,44	−0,21
	+77	*+29*	*+13*	*+9,9*	*−35*	*−2,9*
8	−72	−24	−8,0	−2,7	−0,89	−0,42
	+99	*+35*	*+13*	*+6,5*	*+4,5*	*+5,1*

Diffusion.

Die Diffusionskonstanten sind mit Hilfe von Lamms Skalenmethode bestimmt worden (*16*, *17*.) Man schichtet hierbei die Lösung unter das reine Lösungsmittel in einer vertikalen Diffusionszelle und bestimmt in verschiedenen Zeitpunkten die Skalenstrichverschiebungen, die dem Konzentrationsgradienten in verschiedenen Höhen der Zelle proportional sind. Ist die diffundierende Substanz einheitlich und unter der Voraussetzung, dass die Diffusionskonstante und das Brechungsindexinkrement dn/dc

in dem im Versuch vorkommenden Konzentrationsintervall konstant sind, wird die Beziehung zwischen der Skalenstrichverschiebung Z und dem Abstand x von der ursprünglichen Grenzfläche durch die Gauss'sche Verteilungskurve dargestellt. Hierbei wird weiter vorausgesetzt, dass während des Versuchs keine merkbaren Konzentrationsgradienten am Zellboden oder am Meniskus vorkommen.

Aus der experimentell bestimmten Beziehung zwischen x und Z kann D auf viele verschiedene Arten berechnet werden. Für eine einheitliche Substanz geben natürlich alle Berechnungsmethoden denselben Wert. Wendet man dagegen die für einheitliche Substanzen geltenden Formeln auf aus ungleichen Molekülarten bestehende Stoffe an, so erhält man Mittelwerte für D, die bei der Anwendung verschiedener Berechnungsmethoden beträchtlich voneinander abweichen können. Das hängt damit zusammen, dass diese Mittelwerte von den Diffusionskonstanten und Mengenverhältnissen der verschiedenen Molekülarten in der Mischung nicht in der gleichen Weise abhängig sind.

Gelingt es für eine gewisse Berechnungsmethode eine Beziehung zwischen dem aus dieser Methode berechneten Diffusionskonstanten-Mittelwert und den Diffusionskonstanten und Konzentrationen der in der Mischung vorhandenen Komponenten herzustellen, so wird es möglich, die Diffusionskonstante einer Komponente in der Mischung zu berechnen, wenn die Diffusionskonstanten der andern Molekülarten und die Relativkonzentrationen aller Komponenten bekannt sind.

Solche Berechnungen hat der Verfasser, ausgehend von der bekannten Formel (26), ausgeführt.

$$D = \frac{A^2}{4\pi t H^2}. \tag{26}$$

Hier bedeutet A die von der Gradientenkurve und der Abszissenachse eingeschlossene Fläche, H die maximale Höhe der Kurve und t die Diffusionszeit. Diese Formel können wir nun auf sämtliche in der Mischung vorkommenden Komponenten anwenden. Für die i-te Komponente können wir setzen:

$$H_i = \frac{A_i}{2\sqrt{\pi t}\sqrt{D_i}}. \tag{27}$$

Hat das Brechungsindexinkrement für die verschiedenen Molekülarten den gleichen Wert, (man kann annehmen, dass dies für nahe verwandte Proteine mit genügender Genauigkeit der Fall ist), so gilt:

$$\bar{H} = \Sigma H_i \tag{28}$$

wo $\bar{H}$ die maximale Höhe der Gradientenkurve für die Mischung ist. Wir können auch (26) auf die Mischung anwenden und erhalten

$$\bar{H} = \frac{\bar{A}}{2\sqrt{\pi t}\sqrt{\bar{D}}} \tag{29}$$

wo $\bar{D}$ einen gewissen Mittelwert der Diffusionskonstanten der verschiedenen Molekülarten und $\bar{A}$ die zwischen Abszisse und Gradientenkurve der Mischung eingeschlossene Fläche bedeutet. Mit Rücksicht auf (27) und (28) können wir nach (29) setzen:

$$\frac{\bar{A}}{\sqrt{\bar{D}}} = \Sigma \frac{A_i}{\sqrt{D_i}}. \tag{30}$$

Bezeichnet man die Konzentration der i-ten Komponente mit c_i und die Totalkonzentration mit C, so gelten folgende Beziehungen:

$$c_i = k A_i \tag{31}$$

und

$$C = \Sigma c_i = k \Sigma A_i = k \bar{A} \tag{32}$$

wo k eine Konstante bedeutet,

Führen wir schliesslich für die Relativkonzentration der i-ten Komponente c_i/C die Bezeichnung a_i ein, so erhält man nach (30)

$$\frac{1}{\sqrt{\bar{D}}} = \Sigma \frac{a_i}{\sqrt{D_i}}. \tag{33}$$

Hieraus geht hervor, dass $1/\sqrt{\bar{D}}$ der Gewichtsmittelwert der den verschiedenen Komponenten entsprechenden Werte $1/\sqrt{D_i}$ ist.

Wir nehmen nun an, es solle die Diffusionskonstante D für eine in eine Mischung eingehende einheitliche Komponente bestimmt werden. Ihre relative Konzentration bezeichnen wir mit a. Ausserdem nehmen wir an, die Mischung enthalte noch n weitere in sich einheitliche Molekülarten, deren relative Konzentrationen

a_i und Diffusionskonstanten D_i bekannt seien. Wenn wir, wie vorher, den nach Gleichung (26) berechneten Mittelwert sämtlicher in der Mischung vorhandenen Molekülarten mit $\bar{D}$ bezeichnen, so erhält man nach (33)

$$D = \frac{a^2 \bar{D}}{\left[1 - \sqrt{\bar{D}} \sum_{i=1}^{n} \frac{a_i}{\sqrt{D_i}}\right]^2}. \tag{34}$$

Die Genauigkeit, mit der es möglich ist, nach (34) die Diffusionskonstante der Hauptkomponente zu bestimmen, ist nicht nur von der Genauigkeit abhängig, mit der der Mittelwert $\bar{D}$ bestimmt werden kann. Sie beruht auch auf dem Wert der Diffusionskonstanten aller übrigen Molekülarten und der Genauigkeit ihrer Bestimmung. Weiter spielt das Mengenverhältnis der Komponenten eine Rolle und die Genauigkeit, mit der diese Konzentrationsverteilung bekannt ist. Eine Fehlerberechnung macht diese Verhältnisse am einfachsten klar. Nach (34) erhält man

$$\left|\frac{dD}{D}\right| = \frac{1}{a}\sqrt{\frac{D}{\bar{D}}}\left|\frac{d\bar{D}}{\bar{D}}\right| + \\ + \sum_{i=1}^{n} \frac{a_i}{a}\sqrt{\frac{D}{D_i}}\left|\frac{dD_i}{D_i}\right| + 2\left|\frac{da}{a}\right| + 2\sum_{i=1}^{n}\frac{a_i}{a}\sqrt{\frac{D}{D_i}}\left|\frac{da_i}{a_i}\right|. \tag{35}$$

KAP. VI.

Molekulargewichtsbestimmungen.

Die Molekulargewichte der α- und γ-Komponenten wurden nach beiden in der Einleitung genannten Methoden bestimmt, also aus ihren Sedimentations- und Diffusionskonstanten einerseits und aus Sedimentationsgleichgewichten andererseits. Die zu diesen Bestimmungen zur Verfügung stehenden Lösungen enthielten Mischungen mehrerer Molekülarten. Die Möglichkeiten, unter solchen Bedingungen Molekulargewichte aus Sedimentationsgleichgewichten zu berechnen und die Bestimmung der Diffusionskonstanten sind theoretisch im vorhergehenden Kapitel behandelt. Die dort ausgearbeiteten Berechnungsmethoden wurden bei den ausgeführten Bestimmungen verwendet.

Bestimmung von Diffusionskonstanten.

Die Diffusionsversuche führte man nach der von Lamm ausgearbeiteten Methode aus (*16*, *17*).

Die Diffusionskonstante der α-Komponente, D_α, bestimmte man an Lösungen, die ausser α noch 15—20 % γ enthielten und die der γ-Komponente, D_γ, an Lösungen, die ausser γ 15—30 % α und sehr kleine, bis zu 15 % betragende Mengen δ enthielten. Die Mitteldiffusionskonstante $\bar{D}$ berechnete man nach Gleichung (26). Daraus sollte man dann die Diffusionskonstante der betreffenden Komponente nach Gleichung (34) berechnen. Im vorliegenden Fall waren doch zu Beginn die Diffusionskonstanten aller in der Mischung enthaltenen Komponenten unbekannt, da keine rein erhalten und separat bestimmt werden konnte. Deshalb ging man auf folgende Weise vor. Der Diffusionskonstante der δ-Komponente, D_δ, teilte man den Wert 4,0 [1] zu. Wahr-

[1] Die Diffusionskonstante ist in Einheiten von 10^{-7} c. g. s. ausgedrückt.

scheinlich weicht dieser Wert höchst 10 % vom rechten Wert ab, nach den früher für eine Anzahl Proteine gefundenen Werten (u. a. für die Samenglobuline Edestin, Amandin und Excelsin) zu urteilen, deren Sedimentationskonstanten annäherungsweise mit der der δ-Komponente übereinstimmen. (Vgl. die Zusammenstellung in Svedberg und Pedersens Monographie.) Ausserdem zeigt eine Fehlerberechnung nach Gleichung (35), dass ein gewisser relativer Fehler in D_δ im vorliegenden Fall einen relativen Fehler in D_γ verursacht, der nur 1/5—1/4 so gross ist. Nach Festlegen von D_δ berechnete man D_α und D_γ nach Gleichung (34) durch sukzessive Näherung auf folgende Weise. D_γ teilte man den Wert 4,2 zu; dies ergab für die Bestimmungen an α-reichen Lösungen $D_\alpha = 8{,}54$. Unter Benützung dieses Wertes erhielt man für die Bestimmungen an den γ-reichen Lösungen $D_\gamma = 4{,}35$; die fortgesetzte Näherung gab $D_\alpha = 8{,}44$, $D_\gamma = 4{,}36$; $D_\alpha = 8{,}43$ und wiederum $D_\gamma = 4{,}36$.

Die Resultate der Diffusionsversuche sind in Tabelle 7 zusammengestellt. $\bar{D}$ ist ein Mittelwert, in der Regel von 4 Bestimmungen, entsprechend bestimmten Zeitpunkten im Lauf von zwei

Tabelle 7.

Die Diffusionskonstanten der α- und γ-Komponenten.

Nr	$\bar{D}$	Relativkonzentration			D_α	D_γ	Mittel	
		α	γ	δ			D_α	D_γ
1	7,41	0,82	0,18		8,50			
2	7,60	0,82	0,18		8,79			
3	7,21	0,86	0,14		7,93		8,4 (8,43)	
4	7,02	0,80	0,20		8,07			
5	7,42	0,78	0,22		8,88			
6	4,85	0,33	0,54	0,13		3,85		
7	4,81	0,24	0,60	0,15		4,06		
8	5,43	0,32	0,57	0,11		4,66		
9	4,74	0,15	0,72	0,13		4,42		4,4 (4,36)
10	5,23	0,24	0,64	0,12		4,73		
11	6,25	0.30	0,70	+		4,21		
12	5,14	0,20	0,80	+		4,62		

Tagen, der gewöhnlichen Versuchszeit. Die Werte sind auf Wasser von 20° C reduziert. Die relative Konzentration der Komponenten bestimmte man aus den bei Ultrazentrifugierungen erhaltenen Sedimentationsgeschwindigkeitsdiagrammen durch graphische Integration. Die totale Proteinkonzentration variierte von ungefähr 0,5 bis ungefähr 1 %. Die Versuchstemperatur betrug 20° C. In der Tabelle sind nur die letzten bei der sukzessiven Näherung erhaltenen Werte aufgeführt. Bei der Berechnung von D_α setzte man also $D_\gamma = 4{,}36$, und bei der Berechnung von D_γ, $D_\alpha = 8{,}43$ und $D_\delta = 4{,}0$.

Molekulargewichtsbestimmungen aus Sedimentations- und Diffusionskonstanten.

Zur Berechnung des Molekulargewichts einer Substanz muss das spezifische Volumen bestimmt werden. Solche Bestimmungen führte man für die Gerstenglobuline an zwei Lösungstypen aus, teils solchen mit ca. 80 % α teils mit ca. 80 % γ. Die totale Proteinkonzentration variierte zwischen 1,4 und 2,4 %. Als Lösungsmittel verwendete man 0,3-m NaCl, da die Phosphate im Standardpuffer die Konzentrationsbestimmungen erschweren.

Die pyknometrischen Bestimmungen führte Herr Professor Carl Drucker aus, dem der Verfasser hier seinen Dank aussprechen möchte. Innerhalb der Fehlergrenzen sind die bei verschiedenen Konzentrationsverhältnissen von α und γ gefundenen Werte für die spezifischen Volumina gleich. Der Mittelwert ist 0,72. Die verschiedenen Bestimmungen wichen maximal 2 % von diesem Wert ab.

In Tabelle 8 sind die für α und γ erhaltenen Werte der Sedimentations- und Diffusionskonstanten, des spezifischen Volumens und der daraus nach Gleichung (2) berechneten Molekulargewichte zusammengestellt.

Tabelle 8.

Die Molekulargewichte der α- und γ-Komponenten berechnet aus Sedimentations- und Diffusionskonstanten.

Komponente	s	D	V	M
α	2,49	8,4	0,72	26 000
γ	8,30	4,4	0,72	166 000

Molekulargewichtsbestimmungen aus Sedimentationsgleichgewichten.

Sämtliche Sedimentationsgleichgewichte wurden nach der vorher genannten Skalenmethode ausgeführt. Man verwendete bei jedem Versuch zwei oder drei Zellen des parallelwandigen Typs. Die darin enthaltenen Lösungen befanden sich da in einem etwas verschiedenen Abstand vom Rotationszentrum. Die Schichthöhe der Lösungen betrug 4 mm. Man liess das Gleichgewicht sich bei zwei verschiedenen Umdrehungszahlen einstellen, was zusammen ungefähr 11 Tage in Anspruch nahm. Die Zentrifugalkraft variierte zwischen 630 und 4 000 × g. Die Versuchstemperatur betrug ungefähr 12° C. Die Konzentration der Lösungen bestimmte man durch graphische Integration der Sedimentationsdiagramme bei einer Ultrazentrifugierung. Die Zusammensetzung war ungefähr gleich wie bei den Diffusionsversuchen; man verwendete sowohl α-reiche als auch γ-reiche Lösungen. Zur Berechnung ist die Kenntnis des Brechungsindexinkrements ($\alpha = dn/dc$) notwendig. Es wurde für beide Lösungstypen bestimmt. Sie gaben übereinstimmende Resultate. Bei den Wellenlängen 436 mμ und 546 mμ erhielt man die Werte $184 \cdot 10^{-5}$ resp. $179 \cdot 10^{-5}$, wobei die Konzentration in g per 100 g Lösung ausgedrückt ist. Die Gewichtsmittelwerte berechnete man nach der vom Verfasser angegebenen Methode (Gleichung (12)). Die Molekulargewichtsberechnung aus Gewichts- und Z-Mittelwerten führte man nach den im Kapitel V angegebenen Prinzipien aus.

Auf den ersten Blick kann man den Eindruck gewinnen, die α-reichen Lösungen mit ungefähr 80 % α und 20 % γ eigneten sich für die Bestimmung des Molekulargewichts von α. Das ist jedoch nicht der Fall. Wenn auch der Gewichtsmittelwert der hier angewendet werden muss, für die Berechnung zugrunde gelegt wird, so wird das Resultat ausserordentlich unsicher, trotz der hohen Relativkonzentration der α-Komponente. Unter Voraussetzung der obigen Zusammensetzung und unter Anwendung der aus Sedimentations- und Diffusionskonstanten gewonnenen Molekulargewichten der α- und γ-Komponenten ($M_\alpha = 26\,000$, $M_\gamma = 166\,000$) gibt eine Fehlerberechnung (vgl. Gleichung (22))

$$\left|\frac{\Delta M_\alpha}{M_\alpha}\right| = 2{,}6\left|\frac{\Delta M_w}{M_w}\right| + 1{,}6\left|\frac{\Delta M_\gamma}{M_\gamma}\right| + 5{,}4\left|\frac{\Delta a_\alpha}{a_\alpha}\right|$$

wo a_α die relative Konzentration der α-Komponente bedeutet. Nehmen wir M_w, M_γ und a_α alle mit einem Fehler von 5 % behaftet an, was nicht undenkbar ist, so könnte der Fehler im Molekulargewicht von α bis zu 50 % betragen. Bei Versuchen, aus dem Sedimentationsgleichgewicht solcher Lösungen M_α aus M_w zu berechnen, erhielt man auch stark variierende und wenig wahrscheinliche Werte.

Eine solche α-reiche Lösung eignet sich folglich nicht zur Berechnung des Molekulargewichts der α-Komponente. Interessant ist, dass man aber das Molekulargewicht der γ-Komponente berechnen kann. Dies beruht darauf, dass sie wegen der präparativen Vorgeschichte ziemlich frei von Verunreinigungen mit höheren Molekulargewichten als γ sind. In diesem Fall muss man den Z-Mittelwert anwenden. Eine Fehlerberechnung unter denselben Voraussetzungen wie vorher ergibt (vgl. Gleichung (23))

$$\left|\frac{\Delta M_\gamma}{M_\gamma}\right| = 0{,}83\left|\frac{\Delta M_z}{M_z}\right| + 0{,}17\left|\frac{\Delta M_\alpha}{M_\alpha}\right| + 0{,}31\left|\frac{\Delta a_\gamma}{a_\gamma}\right|$$

Aus dieser Fehlerberechnung geht vor allem hervor, was für eine geringe Rolle ein Fehler im eingesetzten Wert von M_α spielt.

In Tabelle 9 sind die Resultate von einigen Sedimentationsgleichgewichten zusammengestellt, bei denen das Molekulargewicht von γ aus M_z berechnet ist.

Tabelle 9.

Sedimentationsgleichgewichte von α-reichen Lösungen. Das Molekulargewicht der γ-Komponente, M_γ, ist ausgehend vom Z-Mittelwert, M_z, berechnet.

Nr	Relativkonzentration		Temp.	Umdrehungszahl p. sek.	$M_z \cdot 10^{-3}$			M_γ
	α	γ			Zelle B	Zelle C	Mittelwert	
1	0,82	0,18	10°	138		117	117	178 000
2	0,70	0,30	10°	111 129	115 111	113 110	112	148 000
3	0,80	0,20	12°	129	154	116	135	194 000

Die γ-reichen Lösungen, die bei den Sedimentationsgleichgewichten verwendet wurden, enthielten gegen 80 % γ und wechselnde Mengen α und δ. Für die Berechnungen verwendete man $M_\alpha = 26\,000$. Die δ-Komponente muss ein höheres Molekulargewicht haben als γ. Aus Gründen, die später ausgeführt werden, gab man ihr einen Molekulargewichtswert von 280 000. Eine fehlerhafte Schätzung des Molekulargewichts dieser Komponente bedeutet weniger, wenn man M_γ aus M_w berechnet, als wenn man M_z zugrunde legt. Setzt man einen M_δ-Wert, der 10 % höher ist, ein, ändert sich M_γ bei diesen Versuchen im Mittel um 2,5 %. Deshalb legte man M_w den Berechnungen zugrunde. Übrigens waren die Z-Mittelwerte ziemlich unsicher, weil die Gradientenkurven, auch bei mässigen Umdrehungszahlen, gegen den Zellboden hin sehr steil verliefen, was dort ein Bestimmen der Z-Werte erschwerte. Ein gewisser Fehler in den Z-Werten wirkt bedeutend mehr auf M_z als auf M_w ein. Es zeigte sich auch in der Praxis, dass man bei ein und derselben Zentrifugierung zufriedenstellende Übereinstimmung der M_w-Werte

Tabelle 10.

Sedimentationsgleichgewichte von γ-reichen Lösungen. Das Molekulargewicht der γ-Komponente, M_γ, ist ausgehend vom Gewichtsmittelwert, M_w, berechnet.

Nr	Konzentration $\alpha+\gamma+\delta$ in %	Relativkonzentration α	γ	δ	Temp.	Umdrehungszahl p. sek.	$M_w \cdot 10^{-3}$ Zelle A	Zelle B	Zelle C	Mittelwert	M_γ
1	0,412	0,15	0,72	0,13	10°	55		164	123	141	140 000
						63		154	121		
2	0,640	0,28	0,67	0,05	12°	54	134	149	130	133	167 000
						64	128	134	125		
3	0,454	0,05	0,77	0,18	12°	55	179	179	180	179	165 000
						63	179	177	176		
4	0,454	0,05	0,77	0,18	12°	55	203	189		196	187 000
						64	210	182			
5	0,400	0,20	0,72	0,08	14°	54	105	92	112	109	113 000
						64	122	104	118		
6	0,540	0,18	0,77	0,05	13°	55	178	162		164	189 000
						64	164	153			

für verschiedene Zellen und ungleiche Umdrehungszahlen fand. Die M_z-Werte zeigten dagegen grosse Variationen.

In der Tabelle 10 sind die Resultate einer Reihe von Sedimentationsgleichgewichten γ-reicher Lösungen zusammengestellt.

Die Molekulargewichte der Globulinkomponenten.

Von den hergestellten Lösungen mit Mischungen von Gerstenglobulinen konnten Molekulargewichtsbestimmungen der α- und γ-Komponenten ausgeführt werden. Dabei erhielt man folgende Resultate.

α: Bestimmung aus s und D . . . . . $M_\alpha = 26\,000$
γ: Bestimmung aus s und D . . . . . $M_\gamma = 166\,000$
Bestimmung aus M_z von Sedimentationsgleichgewicht . . . . . $M_\gamma = 173\,000$
Bestimmung aus M_w von Sedimentationsgleichgewicht . . . . . $M_\gamma = 160\,000$

Das Molekulargewicht der α-Komponente berechnete man aus ihren Sedimentations- und Diffusionskonstanten. Es ist denkbar, dass die bei der Präparationsbeschreibung genannten niedermolekularen Verunreinigen nicht vollständig aus der Lösung entfernt wurden. Es ist schwer, dies nach den Sedimentationsdiagrammen zu beurteilen. Die Sedimentationskonstante wurde dadurch sicher nicht berührt, die Diffusionskonstante kann etwas zu hoch geworden sein. Der erhaltene α-Wert würde da zu niedrig sein.

Was die Bestimmungen von M_γ betrifft, ist die Möglichkeit vorhanden, dass die Lösungen Verunreinigungen mit höherem Molekulargewicht als δ enthalten hätten. Dies würde bedingen, dass die gefundenen M_γ-Werte etwas zu hoch wären. Der Mittelwert aus sämtlichen Bestimmungen nach verschiedenen Methoden, unter Berücksichtigung der Versuchsanzahl in den verschiedenen Fällen, wird 166 000. Die überraschend gute Übereinstimmung der Werte von verschiedenen Methoden dürfte auf einer Zufälligkeit beruhen, da die Einzelbestimmungen ziemlich starke Streuung zeigen.

Svedberg fand, dass sich die Molekulargewichte der meisten untersuchten Proteine in gewisse Gewichtsklassen einordnen

lassen. Die Molekulargewichte dieser Klassen stehen in einem einfachen Zahlenverhältnis zueinander. Die Niederste hat ein Molekulargewicht von 17 600 und die übrigen 2, 4, 6, 8, 16 etc. mal soviel, entsprechend den Molekulargewichten 35 200, 70 400, 105 600, 140 800, 282 000, etc. Gewisse Abweichungen kommen doch innerhalb der Gewichtsklassen vor. α lässt sich schwer in eine dieser Gruppen einordnen. Dagegen ist es denkbar, dass γ der 8-Multipelgruppe zugehört.

Bestimmungen des Molekulargewichtes der β-Komponente sind nicht ausgeführt worden. Die hergestellten Lösungen sind auf Grund ihrer Zusammensetzung zur Molekulargewichtsbestimmung ungeeignet. Das gleiche gilt für δ. β sollte nach der Sedimentationskonstante zu urteilen, am ehesten der 6-Multipelgruppe zugehören. Ihr Molekulargewicht sollte da ungefähr 100 000 sein. Die Sedimentationskonstante der δ-Komponente stimmt mit den der 16-Multipelgruppe überein. Diese Gruppe enthält u. a. die Samenglobuline Amandin, Edestin und Excelsin, und es scheint wahrscheinlich, dass δ dasselbe Molekulargewicht hat. In den Molekulargewichtsberechnungen für γ verwendete man deshalb als Molekulargewicht von δ den Wert dieser Gewichtsgruppe.

Aus Molekulargewicht, Sedimentationskonstante und spezifischem Volumen wurde das Reibungsverhältnis f/f_o für α und γ auf die gebräuchliche Art berechnet (*39*, *a*, *b*). f ist der molare Reibungskoeffizient und f_o der Wert, den diese Grösse hätte, wenn das Molekül sphärisch und unhydratisiert wäre. f/f_o-Werte grösser als 1 zeigen, dass die Molekülform von der spärischen abweicht, oder dass das Molekül hydratisiert ist. Für die α-Komponente erhielt man den Wert 1,3 und für die γ-Komponente 1,4.

Zusammenfassung.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Globulinfraktion der Gerste aus vier wohldefinierten Komponenten besteht, die mit α, β, γ und δ bezeichnet wurden. Diese haben voneinander verschiedene physikalisch-chemische Eigenschaften, z. B. hinsichtlich Löslichkeit, Molekulargewicht und des elektrochemischen Verhaltens. Durch eine Kombination von sich hierauf gründenden Fraktionierungsmethoden konnte eine partielle Trennung der Komponenten durchgeführt werden. Die angewendeten Methoden waren: Ausfällung durch Dialyse und Ammoniumsulfat, Ultrafiltrierung, Zentrifugierung und Elektrophorese.

In den reinsten bisher erhaltenen Fraktionen überstieg die Menge der Hauptkomponente 80 %. Es handelte sich um die α- und γ-Komponenten. Die Ausbeute war doch gering. Nach den vorliegenden Untersuchungen zu urteilen, scheinen doch keine prinzipiellen Hindernisse im Wege zu stehen, um zu einer weitergehenden Separierung zu kommen, wenn man nur eine hinreichende Menge Ausgangsmaterial bearbeitet. In den hergestellten β-Fraktionen betrug die Menge dieser Komponente etwa 2/3 der totalen Proteinmenge. Die δ-Komponente macht offenbar einen sehr geringen Bruchteil der ganzen Globulinmenge aus. Systematiche Versuche, diese Komponente rein herzustellen, wurden nicht gemacht.

Für die verschiedenen Komponenten wurden eine Anzahl Molekülkonstanten bestimmt, wobei man folgende Daten erhielt:

Sedimentationskonstanten:

$\alpha = 2{,}49$, $\beta = 6{,}21$, $\gamma = 8{,}30$, $\delta = 12{,}0$. (Einheiten von 10^{-13} c. g. s.)

Diffusionskonstanten:

$\alpha = 8{,}4$ $\gamma = 4{,}4$ (Einheiten von 10^{-7} c. g. s.)

Molekulargewichte:

$\alpha = 26\,000$, $\gamma = 166\,000$

Nach den Sedimentationskonstanten zu schliessen dürften β und δ Molekulargewichte von ungefähr 100 000, resp. 300 000 haben.

Es entzieht sich aller Beurteilung, inwieweit die verschiedenen Komponenten schon in ungelöstem Zustand in der Gerste differenziert sind. Es ist aber von grossem Interesse, dass sie in Extrakten nachgewiesen werden konnten, wenn man als Extraktionsmittel verschiedene Salzlösungen (NaCl, NaBr und NaJ) anwendete. Ihre Eigenschaften scheinen auch von der Art der Isolierung unabhängig zu sein. Man separierte sie z. B. nur durch fraktionierte Dialyse oder nur durch Ammoniumsulfatfällung, ohne dass irgendwelche Unterschiede hätten festgestellt werden können.

Es konnte nichts beobachtet werden, was darauf hindeutete, dass die vier Komponenten in irgend einem genetischen Zusammenhang ständen und eine aus der andern entstehen oder in sie umgewandelt werden könnte. Ihre pH-Stabilität wurde untersucht. Die α- und die γ-Komponente sind stabil bis über pH 11, die β-Komponente beginnt schon bei pH 8 zu zerfallen. Auf der sauren Seite wurden Lösungen bis zu einem pH von 4 untersucht, ohne dass man eine Veränderung beobachtete.

In elektrochemischer Hinsicht zeigen die α- und β-Komponente grosse Ähnlichkeit. Ihre isoelektrischen Punkte unterscheiden sich doch deutlich, und für α ist der Wert 5,00, für β 4,90. Der isoelektrische Punkt der γ-Komponente liegt bedeutend höher mit dem Wert 5,70.

Die Möglichkeiten der Berechnung von Diffusionskonstante und Molekulargewicht von einer in einer Mischung enthaltenen Komponente wurden theoretisch behandelt.

Literaturverzeichnis.

1. Abderhalden, E., Handb. d. biolog. Arbeitsmetoden, Abt. I, Teil 8, S. 389, Berlin und Wien 1922.
2. Beams, J. W., Linke, F. W., und Sommer, P., Rev. sci. Instruments, **9**, 248 (1938).
3. Bishop, L. R., J. Inst. Brewing, **34**, 101 (1928).
4. ——, J. Inst. Brewing, **35**, 316 (1929).
5. Brohult, S., Nova Acta Reg. Soc. Sci. Upsaliensis, Ser. IV, Vol. 12, N:o 4 (1940).
6. Denis, P. S., Mémoire sur le sang etc., Paris 1859.
7. Eriksson-Quensel, I.-B., und Svedberg, T., Biologic. Bull., **71**, 498 (1936).
8. Gortner, R. A., Hoffman, W. F., und Sinclair, W. B., Colloid Sympos. Monogr., **5**, 179 (1927).
9. ——, ——, ——, Kolloid-Z., **44**, 97 (1928).
10. Hopkins, R. H., und Krause, B., Biochem. Appl. to Malting and Brewing, S. 114, London 1937.
11. Johns, C. O., Jones, D. B., Gersdorff, C. E. F., u. a., zahlreiche Arbeiten in J. biol. Chemistry, (1916—1923).
12. Krejci, L., und Svedberg, T., J. Amer. chem. Soc., **56**, 1706 (1934).
13. ——, ——, J. Amer. chem. Soc., **57**, 1365 (1935).
14. Lamm, O., Z. physik. Chem., Abt. A, **138**, 313 (1928).
15. ——, Z. physik. Chem., Abt. A, **143**, 177 (1929).
16. ——, Nova Acta Reg. Soc. Sci. Upsaliensis, Ser. IV, Vol. 10, N:o 6 (1937).
17. ——, und Polson, A., Biochemic. J., **30**, 528 (1936).
18. Lansing, W. D., und Kraemer, E. O., J. Amer. chem. Soc., **57**, 1369 (1935).
19. Lundgren, H., Nature [London], **138**, 122 (1936).
20. McCalla, A. G., und Gralén, N., Canad. J. Res., Sect. C, **20**, 130 (1942).
21. Maschke, O., J. prakt. Chem., **74**, 436 (1858).
22. Osborne, T. B., J. Amer. chem. Soc., **17**, 539 (1895).
23. ——, The Vegetable Proteins, London 1909, (sec. ed. 1924).
24. ——, und Harris, I. F., Amer. J. Physiol., **14**, 151 (1905).
25. Pedersen, K. O., Biochemic. J., **30**, 948 (1936).
26. ——, C. R. Trav. Lab. Carlsberg, Sér. chim., **22**, 427 (1938).
27. Philpot, J. St. L., Nature [London], **141**, 283 (1938).

28. Polson, A., Kolloid-Z., **87**, 149 (1939).
29. Quensel, O., und Svedberg, T., C. R. Trav. Lab. Carlsberg, **22**, 441 (1938).
30. Ritthausen, H., J. prakt. Chem., **24**, 257 (1881).
31. Sinclair, W. B., und Gortner, R. A., Cereal Chem., **10**, 171 (1933).
32. Sørensen, M., und Haugaard, G., C. R. Trav. Lab. Carlsberg, **19**, N:o 12 (1933).
33. Staker, E. W., und Gortner, R. A., J. physic. Chem., **35**, 1565 (1931).
34. Steinhardt, J., J. biol. Chemistry, **123**, 543 (1938).
35. Svedberg, T., Kolloid-Z., Zsigmondy-Festschrift, Erg. Bd. zu **36**, 53 (1925).
36. ——, Z. physik. Chem., **121**, 65 (1926).
37. ——, Z. physik. Chem., **127**, 51 (1927).
38. ——, und Heyroth, F. F., J. Amer. chem. Soc., **51**, 550 (1929).
39. ——, und Pedersen, K. O., a) The Ultracentrifuge, Oxford 1940. b) Die Ultrazentrifuge, Dresden und Leipzig 1940.
40. ——, und Sjögren, B., J. Amer. chem. Soc., **52**, 279 (1930).
41. ——, und Stamm, A. J., J. Amer. chem. Soc., **51**, 2170 (1929).
42. Svensson, H., Kolloid-Z., **87**, 181 (1939).
43. Tillmans, J. und Philippi, K., Biochem. Z., **215**, 36 (1929).
44. Tiselius, A., Nova Acta Reg. Soc. Sci. Upsaliensis, Ser. IV, Vol. 7, N:o 4 (1930).
45. ——, Trans. Faraday Soc., **33**, 524 (1937).
46. ——, Kolloid-Z., **85**, 129 (1938).
47. ——, und Gross, D., Kolloid-Z., **66**, 11 (1934).
48. ——, und Svensson, H., Trans. Faraday Soc., **36**, 16 (1939).